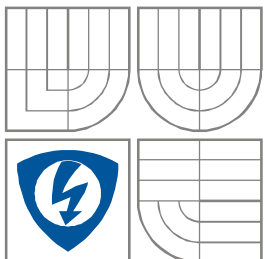




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MĚŘENÍ PROPUSTNOSTI DIALYZAČNÍCH MEMBRÁN

MEASUREMENT OF PERMEABILITY OF DIALYSIS MEMBRANES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

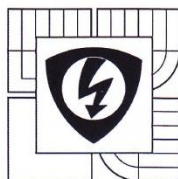
Martina Veselá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Martina Veselá
Ročník: 3

ID: 126757
Akademický rok: 2011/12

NÁZEV TÉMATU:

Měření propustnosti dialyzačních membrán

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s principy léčby dialýzou a její současnou úrovní. Věnujte pozornost materiálům dialyzačních membrán a transportním mechanismům přes dialyzační membrány. 2) Upřesněte a podrobně zformulujte postup umožňující experimentálním způsobem stanovit propustnost dialyzačních membrán v laboratorním měřítku. 3) Znázorněte principiální blokové schéma aparatury a zdůvodněte použití jednotlivých komponent. Popište činnost aparatury jako celku. 4) Stanovte postup umožňující s pomocí chemických analýz zjišťovat koncentrace vybraných uremických toxinů ve vodných roztocích. 5) Odvoďte výpočtové vztahy umožňující na základě naměřených koncentrací látek kvantitativním způsobem stanovit propustnost membrány na jednotlivé látky. 6) S danou aparaturou proveďte potřebný počet měřicích cyklů spojených s odběrem vzorků. Vzorky analyzujte a pomocí zjištěných koncentrací a odvozených vztahů vypočítejte součinitel prostupu hmoty jakožto ukazatele propustnosti membrány. 7) Proveďte diskusi nad získanými výsledky.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

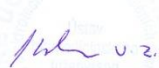
- [1] JÖRRES, A.; RONCO, C.; KELLUM, J.A. Management of acute kidney problems. Berlin: Springer, 2010, 681 p. ISBN 978-3-540-69413-7.
[2] DAUGIRDAS, J.T.; ING T.S. Handbook of dialysis. 1st ed. Boston: Little, Brown, 1988, 566 p. ISBN 03-161-7382-7.

Termín zadání: 6.2.2012

Termín odevzdání: 25.5.2012

Vedoucí práce: doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.

Konzultanti bakalářské práce: Ing. Ervín Odehnal, CSc.


prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je seznámení s teoretickými principy dialýzy a stanovení propustnosti dialyzační membrány pomocí experimentálně sestavné aparatury. Úvodní část je věnována základním poznatkům o léčbě dialýzou a její současnou úrovni. Navazuje kapitola uvádějící přehled různých typů dialyzačních membrán a hlavních charakteristik jednotlivých materiálů, ze kterých se membrány vyráběly dříve a ze kterých jsou vyráběny nyní. Teoretická příprava na praktickou část práce objasňuje základní pojmy, principy a procesy spjaté s přechodem hmoty přes dialyzační membrány a dialýzou. Dále je popsán a zformulován teoretický postup, jak experimentálním způsobem stanovit propustnost dialyzačních membrán v laboratorním měřítku. Blokovými schématy jsou znázorněny dvě možné konfigurace experimentální měřicí aparatury pracující buď ve nestacionárním nebo stacionárním režimu měření. Základem pro stanovení propustnosti membrány je odebrání vzorků v daných časových intervalech z krevní i dialyzátové strany a spektrofotometrické zjištění koncentrací vzorků. Samotnou praktickou část tedy ještě předchází kapitola zabývající se postupem při analýze odebraných vzorků. Následuje odvození vztahů pro výpočet součinitele prostupu hmoty. Koncentrační průběh na krevní a dialyzátové straně při nestacionárním způsobu měření je modelován v programu Simulink. Praktická část práce využívá výše uvedených teoretických znalostí a předpokladů a realizuje konkrétní měření v nestacionárním režimu. Hodnotící část práce dokumentuje získané výsledky a vyhodnocuje pomocí odvozených výpočtových vztahů. V závěrečné části je zhodnocen a diskutován celý postup měření včetně získaných výsledků.

Abstract

Familiarization with dialysis theoretical principles and determination of dialysis membrane permeability with the help of experimentally assembled apparatus is the aim of this bachelor thesis. The introduction part deals with basic knowledge concerning treatment with dialysis and its current quality. There continues a chapter stating an overview of dialysis membranes different types and main characteristics of individual materials, which the membranes were made of and which they are produced now. Theoretical preparation for the practical part of the thesis clarifies the basic notions, principals and processes connected with the mass transfer through dialysis membranes and dialysis. Further on, theoretical process is described and phrased how to determine dialysis membranes permeability in a laboratory scale in an experimental way. Two possible configurations of experimental apparatus are illustrated with block schemes working either in a non-stationary or a stationary regime of measurement. The basis to determine membrane permeability is sampling in specified time intervals from blood and dialyze side and spectrophotometric detection of samples concentration. The practical part itself is preceded with the process with collected samples analysis. Then, it is followed with relations derivation for mass transfer coefficient calculation. Concentration progress on blood and dialyze side with non-stationary way of measurement is modelled in Simulink programme. The practical part of the thesis uses the mentioned above theoretical knowledge

and assumptions and it realises concrete measurements in non-stationary regime. Evaluating part of the thesis documents the obtained results and assesses them with the help of derived equations. The whole process of measurement including obtained results is evaluated and discussed in the final part.

Klíčová slova

Dialýza; dialyzátor; očista krve; dialyzát; difúze; konvekce; ultrafiltrace; transmembránový tlak; koncentrační gradient; dialyzační membrána; propustnost; biokompatibilita; low-flux; high-flux; hemodialýza; hemofiltrace; hemodialfiltrace; uremické toxiny; koeficient prostupu hmoty.

Keywords

Dialysis; dialyzer; blood purification; dialysate; diffusion; convection; ultrafiltration; concentration gradient; transmembrane pressure; dialysis membrane; permeability; biocompatibility; low-flux; high-flux; hemodialysis; hemofiltration; hemodialfiltration; uremic toxins; mass transfer coefficient.

Bibliografická citace

VESELÁ, M. Měření propustnosti dialyzačních membrán. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 70 s., 7 příl. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Měření propustnosti dialyzačních membrán jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce, odborného konzultanta a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 25. května 2012

.....
podpis autora

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce doc. Ing. Janě Kolářové, Ph.D. za účinnou metodickou a pedagogickou pomoc při zpracování práce a technické zázemí, které mi na realizaci praktické části na fakultě zajistila. Mé díky také patří panu Ing. Ervínu Odehnalovi, CSc. za konzultace, odborné rady a komponenty nezbytné pro sestavení aparatury.

V Brně dne 25. května 2012

.....
podpis autora

Obsah

Seznam obrázků	4
Seznam tabulek.....	5
Úvod.....	6
1 Léčba dialýzou	7
1.1 Historické souvislosti.....	7
1.2 Současná úroveň	8
2 Základní pojmy a principy	10
2.1 Přehled základních sledovaných látek	10
2.1.2 Základní vlastnosti sledovaných látek a jejich vliv na lidský organismus.....	10
2.2 Transport látek při dialýze	11
2.2.1 Difúze	11
2.2.2 Ultrafiltrace.....	12
2.2.3 Kombinace difuze a konvekce	13
2.2.4 Prosévací koeficient	13
2.2.5 Celkový odpor proti transportu látek	14
2.3 Účinnost dialyzátoru	14
2.4 Techniky náhrady funkce ledvin	16
2.4.1 Hemodialýza	16
2.4.2 Hemofiltrace	16
2.4.3 Hemodiafiltrace	16
3 Dialyzační membrány	17
3.1 Historický vývoj membrán	17
3.2 Membránové materiály.....	17
3.2.1 Membrány odvozené od celulózy.....	17
3.2.2 Syntetické membrány	18
3.3 Klasifikace dialyzačních membrán	20
3.3.1 Propustnost membrán.....	20
3.3.2 Biokompatibilita membrán	20

4	Návrh experimentální aparatury	22
4.1	Základní koncepce	22
4.1.1	Možné měřicí režimy	22
4.1.2	Výběr měřicího režimu pro realizaci experimentální aparatury	23
4.2	Komponenty potřebné pro sestavení aparatury	23
4.2.1	Popis jednotlivých komponent	24
5	Příprava na měření	31
5.1	Komponenty použité pro analýzu	31
5.2	Příprava krevní a dialyzátové vsádky	31
5.3	Vytvoření vodného roztoku krve	32
5.4	Analýza vzorků	32
5.4.1	Močovina	32
5.4.2	Stanovení koncentrace močoviny v odebraném vzorku (Bio-La Test)	33
5.4.3	Kreatinin	34
5.4.4	Stanovení koncentrace kreatininu v odebraném vzorku (Bio-La Test)	34
5.5	Odvození výpočtových vztahů	36
5.6	Simulace průběhu koncentrací v prostředí Simulink	38
5.6.2	Odvození výpočtových vztahů užitých v simulaci	38
5.7	Doplňující možnost odvození výpočtových vztahů	42
6	Měření a vyhodnocení naměřených hodnot	43
6.1	Obecný postup měření	43
6.1.1	Rychlost proudění měřicí celou	43
6.2	Realizace měření	44
6.2.1	Měření č. 1	45
6.2.2	Měření č. 2	46
6.2.3	Měření č. 3	46
6.3	Výpočet součinitele prostupu hmoty	46
6.4	Dokumentace naměřených hodnot a grafických výstupů	48
7	Diskuse	56
	Závěr	58

Seznam literatury	59
Seznam veličin	61
Seznam zkratk	61
Seznam příloh	62

Seznam obrázků

Obrázek 1.1	Dialyzátor Chiraplat vyráběný Chiranou ve Staré Turé, převzato z [5].....	8
Obrázek 1.2	Online heamodialyzační systém firmy Fresenius, převzato z [13]	9
Obrázek 2.1	Schéma difuzivního procesu přes dialyzační membránu [1]	11
Obrázek 2.2	Závislost mezi ultrafiltrací a transmembránovým tlakem, převzato z [2].....	12
Obrázek 2.3	Znázornění sieving koeficientu pro látky o různé koncentraci přes stejnou polopropustnou membránu [14]	13
Obrázek 2.4	Srovnání prosévacích koeficientů pro různé druhy membrán, převzato z [10]	14
Obrázek 2.5	Schéma prostupu látek přes semipermeabilní membránu, převzato z [10].....	15
Obrázek 2.6	Závislost clearance dialyzátoru na průtoku krve, převzato z [2].....	15
Obrázek 3.1	Srovnání průřezu tří různých syntetických high-flux membrán na snímku z elektronového mikroskopu, převzato z [1]	19
Obrázek 4.1	Oběhový termostat JulaboED- 5M, převzato z [15]	24
Obrázek 4.2	Měřicí cela z čelního, bočního a horního pohledu	25
Obrázek 4.3	Sestavená aparatura (bez termočlánekových sond)	26
Obrázek 4.4	Principiální blokové schéma aparatury – stacionární způsob měření, vysvětlivky viz Tabulka 4.1 a Tabulka 4.2	27
Obrázek 4.5	Principiální blokové schéma aparatury – nestacionární způsob měření, vysvětlivky viz Tabulka 4.1 a Tabulka 4.2	28
Obrázek 4.6	Měřicí cela z bočního profilu, vysvětlivky viz Tabulka 4.1 a Tabulka 4.2.....	30
Obrázek 5.1	Kompartmentový model experimentálního měření.....	38
Obrázek 5.2	Simulace koncentračních průběhů podle rovnic (5.46) a (5.47)	40
Obrázek 5.3	Simulace koncentračních průběhů podle rovnic (5.17) a (5.18)	41
Obrázek 5.4	Výstup simulací - průběhy koncentrací $c_B(t)$ a $c_D(t)$	41

Seznam tabulek

Tabulka 1.1	Údaje ze statistiky České nefrologické společnosti pro rok 2010 [12]	9
Tabulka 2.1	Základní sledované látky a jejich molekulová hmotnost [5].....	10
Tabulka 3.1	Rozdělení dialyzátorů založené na propustnosti dialyzační membrány [1]	20
Tabulka 3.1	Rozdělení dialyzačních membrán podle míry biokompatibility [1].....	21
Tabulka 4.1	Legenda použitých symbolů pro stacionární i nestacionární způsob měření ...	29
Tabulka 4.2	Legenda použitých zkratk.....	29
Tabulka 5.1	Souhrnné údaje o vodném roztoku krve.....	32
Tabulka 5.1	Přehled objemů pipetovaných roztoků, BLT urea, převzato z Příloha B.....	33
Tabulka 5.2	Vzorová tabulka pro zaznamenávání naměřených absorbancí a výpočet koncentrací látky urea, použité hodnoty viz Tabulka 6.2	34
Tabulka 5.1	Přehled objemů pipetovaných roztoků, BLT kreatinin, převzato z Příloha C .	35
Tabulka 5.2	Vzorová tabulka pro zaznamenávání naměřených absorbancí a výpočet koncentrací, použité hodnoty viz Tabulka 6.3	35
Tabulka 6.1	Měření č. 1: naměřené hodnoty průběhu koncentrací v časovém schématu 0 min – 70 min	48
Tabulka 6.2	Měření č. 2: naměřené hodnoty koncentračního průběhu urey v časovém schématu 0 min – 25 min	50
Tabulka 6.3	Měření č. 3: naměřené hodnoty koncentračního průběhu kreatininu v časovém schématu 0 min – 30 min	52

Úvod

Lidé s nedostatečnou funkcí ledvin jsou léčeni pomocí hemodialýzy. Nahrazení funkce ledvin dialýzou zahrnuje nejen samotný proces očišťování krve, ale také složitou péči o pacienta. Realizace klasické dialýzy se provádí tak, že krev je vyvedena výstupem z těla pacienta do extrakorporálního (mimotělního) krevního oběhu, kde je čerpána do dialyzátoru a z něj zpět do těla pacienta. Hemodialýza dnes patří v lékařství mezi standardní léčebné postupy a klade se velký důraz na její úroveň. Hledají se tedy stále možnosti inovace hemodialýzy. Kromě hemodialýzy prováděné vývodem krve z těla pacienta do extrakorporálního obvodu existuje ještě peritoneální dialýza, kde dialyzační membránou je peritoneum (blána pobřišnice). Tato bakalářská práce je popisuje klasickou dialýzu prováděnou přes dialyzační membránu v dialyzačním přístroji, fyzikálními mechanismy dialýzy a možnostmi realizace měření propustnosti dialyzační membrány v laboratorním měřítku.

Práce je rozdělena do 7 kapitol. První kapitola obsahuje několik historických poznámek o hemodialyzační léčbě a srovnání se současnou situací.

Ve druhé kapitole jsou uvedeny základní pojmy, jejichž znalost je nezbytná pro pochopení celého procesu dialýzy, a stejně tak pro pochopení experimentálního měření popisovaného od čtvrté kapitoly.

Následující kapitola obsahuje přehled jednotlivých typů dialyzačních membrán a jejich charakteristické vlastnosti. Shrnuje výhody a nevýhody použití jednotlivých typů pro proces očisty krve, dialýzu.

Návrh měřicí aparatury na stanovování propustnosti dialyzačních membrán, včetně znázornění blokového schématu je popsán v kapitole čtvrté. Je zde uveden i popis jednotlivých komponent aparatury a výběr měřicího režimu, ve kterém bude měření prováděno.

Samotnému měření musí předcházet pečlivá příprava na měření. Přípravou se zabývá kapitola pátá. Zahrnuje popis způsobu spektrofotometrické analýzy odebraných vzorků za účelem zjištění koncentrace sledované látky ve vzorku. Nejdůležitější část zastupuje odvození stěžejních vztahů, podle kterých se z naměřených koncentrací vypočítá součinitel prostupu hmoty, který je ukazatelem propustnosti dané membrány pro danou sledovanou látku.

Šestá kapitola popisuje realizaci experimentálního měření a grafickou analýzu získaných výsledků.

V poslední kapitole, v diskuzi získaných výsledků, jsou hodnoty dosazeny do příslušných odvozených výpočtových vztahů. Hodnoceny jsou nejen konkrétně získané hodnoty, ale i celý postup, který k jejich získání vedl.

1 Léčba dialýzou

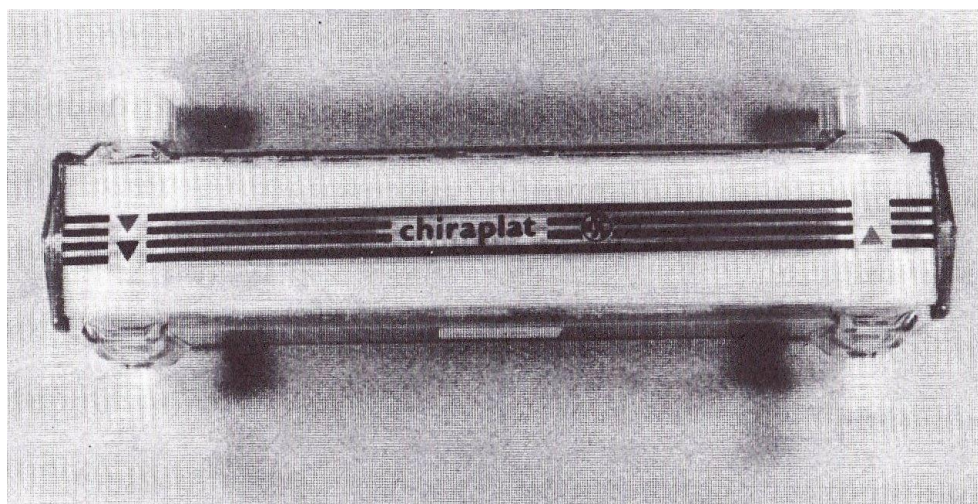
Léčbu dialýzou indikujeme v případě selhání ledvin. Selhání ledvin je stav, kdy ledviny přestávají plnit své základní funkce tj. dialyzační, filtrační a resorpční [2]. Rozlišujeme selhání ledvin akutní a chronické, na základě toho provádíme akutní dialýzu nebo chronickou dialýzu. Hlavním rozdílem v provádění akutní a chronické dialýzy je, že v případě akutní dialýzy pacient nemá vytvořený arteriovenózní shunt neboli trvalý cévní přístup, který se u chronicky nemocných pacientů vytváří s předstihem. Vytvoření shuntu náleží cévní chirurgii. Akutní dialýza se provádí pomocí speciálního dialyzačního žilního katetru. Akutní selhání ledvin může způsobit úraz, intoxikace organismu či selhání více orgánových systémů. Může být také výsledkem hyperkalemie, acidózy, hypervolémie nebo oligurie trvající déle než 3 dny. U pacientů s chronickým onemocněním ledvin dochází ke kontinuálnímu zhoršování stavu nemoci, ve kterém funkce ledvin postupně zaniká. Manifestace nemoci je však neustále monitorována. Dialýza se zahajuje při poklesu clearance kreatinu pod jeho dolní limit [7]. Mezi hlavní příčiny chronického selhání ledvin patří diabetická nefropatie, hypertenzní nefroskleróza, glomerulonefritida. Zvláště u diabetické nefropatie můžeme pozorovat stoupající trend [9].

1.1 Historické souvislosti

Vývoj dialýzy prošel několika různými fázemi. Počátky hemodialýzy sahají do roku 1854, kdy skotský chemik Thomas Graham sestavil první primitivní dialyzátor. Dialýzu zkoumal na prostupnosti stěny hovězího močového měchýře. Následovalo dlouhé období úspěšných i neúspěšných pokusů několika dalších vědců. O průlom se postaral holandský lékař Willem J. Kolff ve 40. letech 20. století provedením první úspěšné dialýzy člověka. Hemodialýza se začala aplikovat jako léčebný postup akutního selhání ledvin. Dalšími významnými mezníky byl tzv. Scribnerův zevní arteriovenózní přístup – shunt. Poprvé jej implantovali Belding Scribner a Wayne Quinton v roce 1960. V roce 1963 uvedl Stanley Shaldon perkutánní kanylaci femorálních cév pro hemodialýzu. Začala tak fáze standardizace a expanze hemodialýzy jako léčebného postupu pro pacienty s chronickým selháním ledvin [1], [10].

V Československé republice bylo první pracoviště umělé ledviny založeno na II. interní klinice prof. Vančury 1. LK UK v Praze. První úspěšnou dialýzu provedli v roce 1955 u pacientky s akutní intoxikací. Od roku 1965 začali provádět pravidelnou dialyzační léčbu pacientů s chronickým selháním ledvin. Dialyzační léčba se začala postupně rozšiřovat i do dalších krajských měst, nicméně z počátku provázely české i slovenské nemocnice tragický nedostatek dialyzátorů. Mnoha občanům, ve srovnání s ekonomicky vyspělejšími zeměmi, nemohla být dialyzační léčba poskytnuta jen proto, že pro ně dialyzátory nebyly a jejich dovoz ze zahraničí možný nebyl. Situaci začal prudce měnit vývoj prvního československého dialyzátoru a jeho zavedení do hromadné výroby. Vývojová fáze

dialyzátoru probíhala ve Výzkumném ústavu zdravotnické techniky v Brně, výroba v Chiraně Stará Turá. Za poměrně krátký čas se tak podařilo zabezpečit dialyzační léčbu pro všechny pacienty [10].



Obrázek 1.1 Dialyzátor Chiraplat vyráběný Chiranou ve Staré Turé, převzato z [5]

1.2 Současná úroveň

Pojem „náhrada funkce ledvin“ („renal replacement therapy“ – RRT) je souhrnným názvem pro hemodialýzu, peritoneální dialýzu a transplantaci. Souhrnně jde o všechny současné postupy léčby selhávání ledvin. Cílem je co nejúčinněji nahradit funkci vlastních ledvin [10]. Počet pacientů v terminálním stádiu onemocnění ledvin závislých na dialýze či transplantaci ledvin prudce vzrůstá v celosvětovém měřítku. V roce 2005 byl počet pacientů téměř 900 000, do roku 2010 byl očekávaný nárůst o dvojnásobek [6].

V ekonomicky vyspělých zemích včetně České republiky je RRT poskytnuta všem, kdo ji potřebují. Nejdokonaleji dokáže nahradit funkci ledvin pouze ledvina transplantovaná. Transplantační obor patří mezi dynamicky vyvíjející se odvětví, které nabízí obnovení prakticky všech renálních funkcí (vylučovací, regulační, metabolické i endokrinní). Na druhou stranu transplantace limituje nedostatek štěpů i to, že zdaleka ne všichni pacienti jsou způsobilí proces transplantace podstoupit. Nehledě na to, že kvalita života pacienta po transplantaci je do značné míry ovlivněna úrovní a délkou předchozí dialyzační léčby (s výjimkou preemptivní transplantace, tj. transplantace bez předchozí dialyzační léčby). Hemodialýza je v současné době stále nejdůležitější a nejpoužívanější léčebnou metodou při RRT. Pro zařazení do dialyzačního programu na rozdíl od transplantačního programu žádná kritéria nejsou. Obvyklou čekací dobou na transplantaci na čekací listině je v průměru 1 rok [7]. Vzhledem k poměrně vysoké mortalitě pacientů na klasické dialýze, která je zhruba 20 let stejná – přibližně 20% pacientů ročně, je neustálou snahou dialyzační techniku inovovat [12].

V roce 1970 s objevem dutého vlákna začaly postupně nahrazovat paralelní deskové dialyzátory s plochou membránou dialyzační systémy s membránou kapilární. Důležitý byl i vývoj objemové kontroly ultrafiltrace (UF) při dialýze. Současné membránové technologie, dialyzační přístroje a dialyzační monitory tvoří složitý dialyzační okruh, umožňující sledovat

a řídit složení dialyzátu, jeho tok, vodivost a teplotu. Nejnovější přístroje také nabízí online hemodiafiltraci (HDF, viz Obrázek 1.2, vysvětlení pojmu viz kapitola 2), monitorování objemu krve, teploty krve a online odhad clearance. Léčba je tím co nejvíce individualizována [1], [13].



Obrázek 1.2 Online hemodialyzační systém firmy Fresenius, převzato z [13]

Inovační snahy se cílí mimo jiné na vývoj zcela nových materiálů dialyzačních membrán, zkoumá se i možnost využití nanotechnologií. Výsledkem by měly být membrány vykazující lepší parametr clearance než membrány současné [4]. Zkoumají se také možnosti, jak vytvořit umělou ledvinu, která by byla implantovatelná a zajišťovala tak kontinuální styk s lidským organismem a možnost nepřetržitého léčebného účinku [6]. Značný význam vývoje umělé ledviny spočívá nejen v lékařském hledisku, ale také v ekonomickém, dialýzy patří k ekonomicky nejnáročnějším odvětvím celého zdravotnictví každého státu.

Tabulka 1.1 Údaje ze statistiky České nefrologické společnosti pro rok 2010 [12]

<i>Základní data ze statistické ročenky:</i>	<i>celkem</i>
Počet dialyzačních středisek:	
– k 31. 12. 2010:	102
– srovnání s rokem 2000:	86
Počet léčených pacientů PMP (na 1 milion obyvatel)	
– k 31. 12. 2010:	602
– srovnání se stavem k 31. 12. 2001):	410
Počet hemoelimačních výkonů:	862 927
Celková mortalita:	16,7 %

2 Základní pojmy a principy

Kapitola je cílena na uvedení základních látek, které jsou pomocí dialýzy z krevního oběhu odstraňovány. Seznámení s mechanismy transportu těchto látek přes dialyzační membrány a možnostmi stanovovat účinnost samotného procesu dialýzy. V závěru kapitoly jsou uvedeny v současné době užívané techniky náhrady funkce ledvin.

2.1 Přehled základních sledovaných látek

Glomerulární filtrát zdravého člověka obsahuje za normálních podmínek látky o molekulové hmotnosti do 58 000 Da. (Filtrát může obsahovat i větší molekuly, ty se však do filtrátu nedostávají filtrací, ale metabolizují se.).

Z hlediska velikosti odstraňovaných látek dělíme látky na malé molekuly, střední molekuly a velké molekuly. Mezi malé molekuly patří látky s hmotností do 500 Da, střední molekuly jsou v rozmezí 500 – 15 000 Da, velké molekuly mají více než 15 000 Da [8].

Pro dialýzu jsou důležité membrány, které nepropustí albumin, bílkovina krevní plazmy o molekulové hmotnosti 66 300 Da. V praxi a při vývoji nových membrán je kromě propustnosti albuminu sledována propustnost dialyzační membrány pro látky viz Tabulka 2.1 [5]:

Tabulka 2.1 Základní sledované látky a jejich molekulová hmotnost [5]

<i>Látka</i>	<i>m_u [Da]</i>
- Uremické toxiny:	
○ močovina - urea	60
○ kreatinin	113
- kyselina močová	168
- vitamín B ₁₂	1 355
- β ₂ -mikroglobulin	11 800
- albumin	66 300

2.1.2 Základní vlastnosti sledovaných látek a jejich vliv na lidský organismus

Močovina je ve vodě rozpustná látka, prakticky bez toxických účinků. Potenciálním toxickým účinkem kreatinu může být blokáce chloridových kanálů, sám o sobě je ale jen málo toxický. Kyselina močová vzniká metabolismem purinů a při jejím hromadění v těle vznikají ledvinové kameny nebo dna. Vitamin B₁₂ je ve vodě rozpustný a pro člověka nezbytný ke správné krvetvorbě a funkci nervové soustavy. β₂-mikroglobulin slouží jako citlivý ukazatel tubulárního poškození ledvin. Jeho zvýšená syntéza je pozorována u některých zánětlivých a nádorových onemocnění [8].

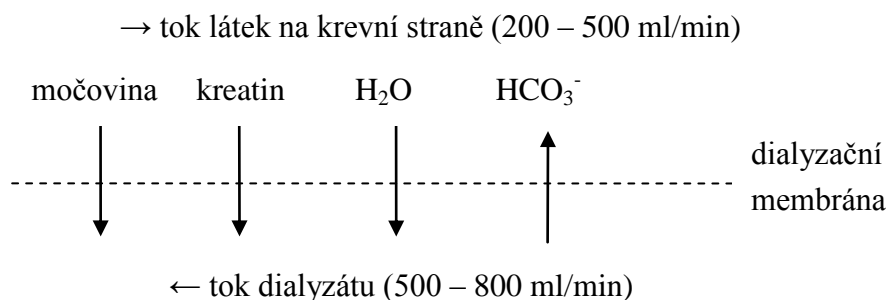
Metabolitů vznikajících v lidském organismu při biologických procesech s potencionálním negativním účinkem je mnoho. Škodlivý efekt má i nadbytek minerálů nebo vody. Dialýza má za úkol co nejvíce poměr nežádoucích látek v krvi snížit. Následující kapitoly jsou pro názornost zaměřeny na odstraňování pouze některých z výše uvedených základních sledovaných látek.

2.2 Transport látek při dialýze

Transport odstraňovaných látek z krve do dialyzačního roztoku probíhá v dialyzátoru přes semipermeabilní (polopropustnou) membránu. Základní mechanismy přechodu látek přes membránu jsou dva: difúze nebo difúze kombinovaná s konvektivní složkou [2].

2.2.1 Difúze

Difúze je pasivní pohyb molekul v daném prostředí z oblasti o vyšší koncentraci sledované látky do oblasti s nižší koncentrací bez uplatnění konvektivní složky. Při hemodialýze difundují katabolity z krve semipermeabilní membránou do dialyzačního roztoku a tím dochází k jejich odstranění z organismu. Semipermeabilní membrána tedy působí jako filtr selektující látky do určité molekulové hmotnosti. Propouští vodu a nízkomolekulární látky, vysokomolekulární látky např. bílkoviny a krevní elementy propouštět nesmí. Pro úpravu acidobazické rovnováhy krve pacienta se přidávají do dialyzátu speciální látky (např. hydrogenuhličitan HCO_3^- nebo acetát), které při dialýze difundují do krve a acidobazickou rovnováhu upraví [2]. Obrázek 2.1 ilustruje tok vybraných látek a směr jejich difuze při hemodialýze.



Obrázek 2.1 Schéma difuzivního procesu přes dialyzační membránu [1]

Proces difúze popisuje koncentrační gradient c_i a difúzní koeficient D_i , viz vztah (2.1). Difuze závisí také na molekulové hmotnosti difundující látky, vlastnostech membrány a všeobecně na teplotě. Čím větší je koncentrační gradient rozpuštěné látky mezi dvěma roztoky, tím rychleji probíhá její transfer do oblasti s nižší koncentrací. Molekulová hmotnost se projevuje tím, že látky s větší molekulovou hmotností prochází membránou pomaleji a hůř, v závislosti na struktuře membrány (tj. velikosti a počtu pórů membrány a na její tloušťce) [2].

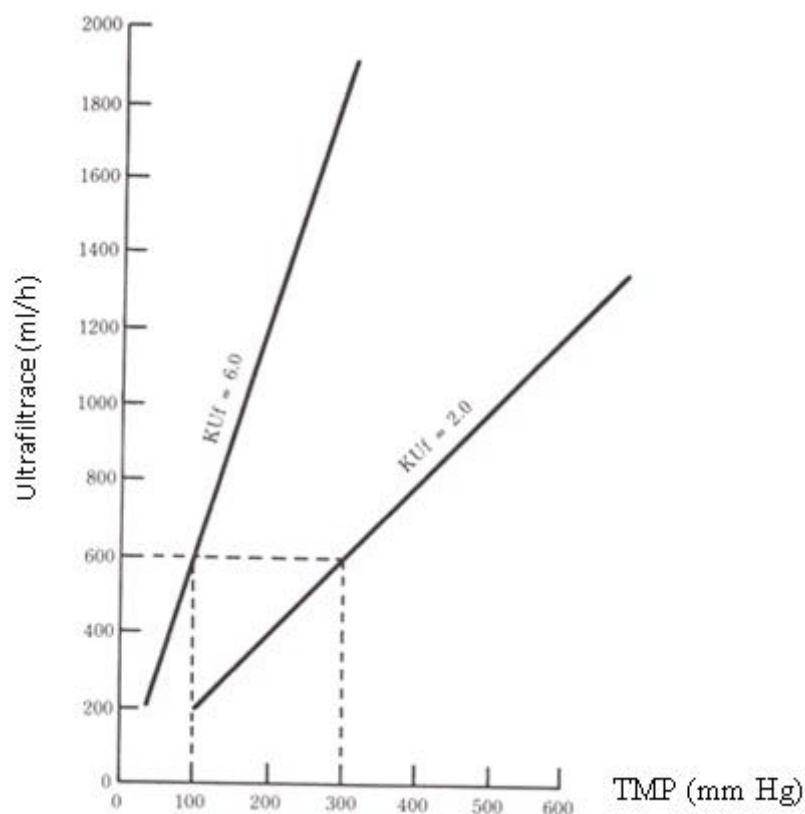
První Fickův zákon o molekulové difúzi vyjadřuje hustotu toku rozpuštěné látky a lze jej obecně zapsat rovnicí:

$$\vec{J}_i = -D_i \cdot \nabla c_i, \quad (2.1)$$

kde \vec{J}_i je hustota toku, D_i difúzní koeficient – difuzivita sledované látky i , ∇c_i je gradient koncentrace, záporné znaménko značí směr pohybu sledované látky do oblasti s nižší koncentrací [1].

2.2.2 Ultrafiltrace

Konvektivní pohyb vody z krve přes membránu je nazýván ultrafiltrace *UTF* a je poháněn nenulovým transmembránovým tlakem. Při dialýze nastává ultrafiltrace v důsledku vyvolání negativního transmembránového tlaku *TMP* na dialyzátové straně. Ultrafiltrační rychlost („ultrafiltration rate“) *UFR* závisí na velikosti *TMP*. Transmembránový tlak vypočítáme jako rozdíl tlaku v krevní a v dialyzátové části. Ultrafiltrace závisí na tloušťce membrány a velikosti pórů, popisuje ji koeficient ultrafiltrace *KUf*. *KUf* je definován jako objem vody, který za jednotku času, při jednotkovém hydrostatickém tlaku na membránu, projde membránou o jednotkové ploše [2]. Obrázek 2.2 ukazuje závislost mezi ultrafiltračním objemem v ml/h a transmembránovým tlakem *TMP* v mmHg pro dva různé dialyzátory o stejné ploše membrány (jeden s $KUf = 2 \text{ ml}/(\text{h} \cdot \text{mmHg})$ a druhý s $KUf = 6 \text{ ml}/(\text{h} \cdot \text{mmHg})$).



Obrázek 2.2 Závislost mezi ultrafiltrací a transmembránovým tlakem, převzato z [2]

2.2.3 Kombinace difuze a konvekce

Při dialýze se sledované látky odstraňují přes dialyzační membránu difúzí. Hnací silou tohoto procesu je tedy hustota toku sledovaných látek viz rovnice 2.1. Transport látek je v případě kombinace difuze s konvektivním pohybem molekul urychlován. Celkovou rychlost transportu popisuje rovnice [1]:

$$\vec{J} = \vec{J}_d + \vec{J}_c \quad (2.2)$$

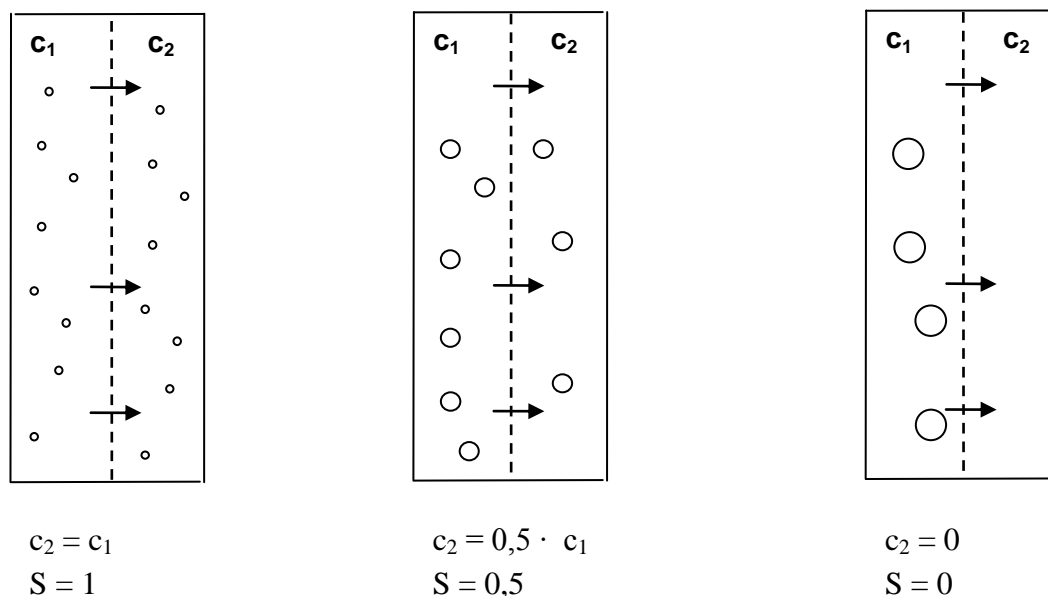
kde \vec{J}_d je rychlost difuzivního přechodu látek a \vec{J}_c je rychlost konvektivního transportu látek.

2.2.4 Prosévací koeficient

Prosévací koeficient označovaný písmenem S (**sieving coefficient**) popisuje, jak se změní koncentrace sledované látky ve filtrátu po průchodu semipermeabilní membránou. Lze jej vypočítat jako poměr koncentrace sledované látky po průchodu membránou (c_2) a před průchodem membránou (c_1), viz vzorec (2.3) [14].

$$S = \frac{c_2}{c_1} \quad (2.3)$$

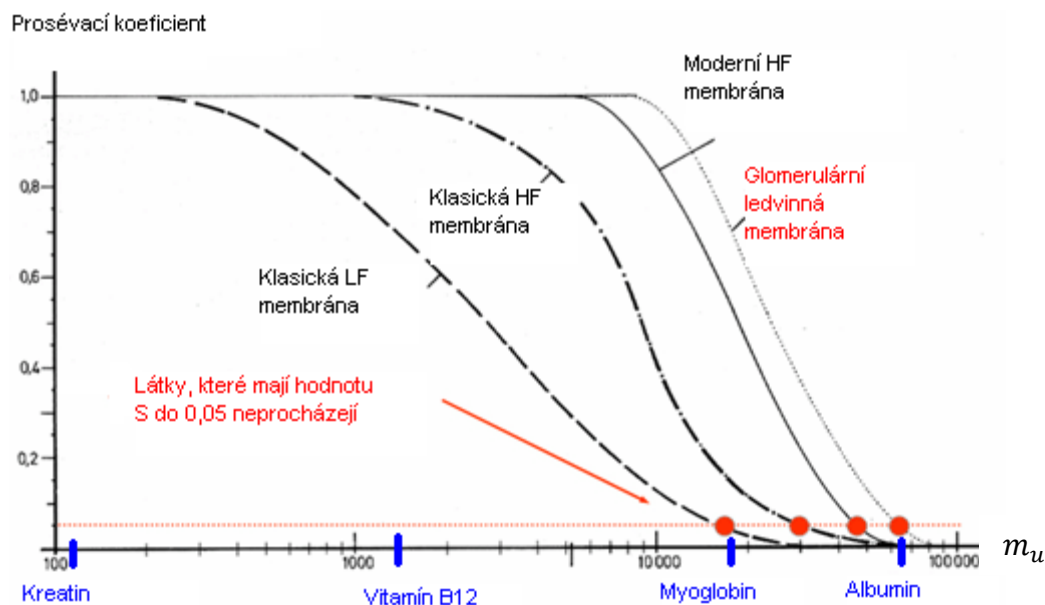
Prosévací koeficient může nabývat hodnot 0 až 1. Hodnota 1 znamená 100% propustnost membrány pro danou látku a při hodnotě 0 látka membránou neprochází vůbec, viz Obrázek 2.3.



Obrázek 2.3 Znáznornění sieving koeficientu pro látky o různé koncentraci přes stejnou polopropustnou membránu [14]

Obrázek 2.4 srovnává prosévací koeficienty několika různých dialyzačních membrán s ledvinnou glomerulární membránou, v závislosti na relativní molekulové hmotnosti M_r . Reálné ledvinné membráně se svým prosévacím koeficientem nejvíce blíží moderní hig-flux membrána. Nejmenší podobnost vykazují klasické low-flux membrány. Vysvětlení pojmů

high-flux a low-flux viz kapitola 3. Z obrázku vyplývá, že pro molekuly s nízkou molekulovou hmotností je prosévací koeficient roven jedné a od určité hodnoty molekulové hmotnosti klesá, pro molekuly s $m_u \leq 10^5$ je $S = 0$ [10].



Obrázek 2.4 Srovnání prosévacích koeficientů pro různé druhy membrán, převzato z [10]

2.2.5 Celkový odpor proti transportu látek

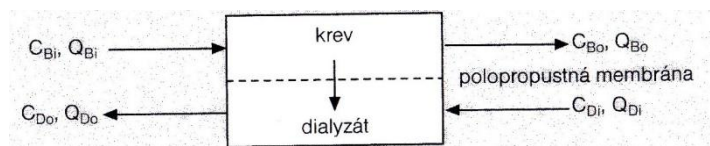
Celkový odpor proti transportu látek přes membránu se skládá ze tří dílčích odporů – přestup sledovaných látek z krve na povrch membrány, průchod látky materiálem membrány a za třetí přestup látky z membrány do dialyzátu. Celkový prostup hmoty je charakterizován součinitelem přestupu hmoty sledovaných látek z krve na membránu, difuzivitou (průchodem látek materiálem membrány) a součinitelem přestupu látek z membrány do dialyzátu. Součet převrácených hodnot těchto součinitelů představuje celkový odpor transportu látek z krve do dialyzátu.

2.3 Účinnost dialyzátoru

Účinnost dialyzátoru se posuzuje podle jeho schopnosti dané uremické toxiny z krve odstraňovat a charakterizuje se jako clearance jednotlivých látek.

Prostup odstraňovaných látek přes membránu probíhá směrem z krve do dialyzátu – po směru koncentračního spádu. Koncentrační spád se při dialýze udržuje přívodem stále čerstvého dialyzátu s nulovou koncentrací odstraňovaných látek. Dialyzát je veden protiproudě, tj. proti průtoku krve (viz Obrázek 2.5), zvyšuje se tím účinnost dialýzy ve srovnání se souproudem.

Účinnost odstraňování závisí na rychlosti průtoku roztoků. Obvyklými hodnotami pro průtok krve je 200 – 400 ml/min (pod 150 ml/min by dialýza nebyla efektivní), průtok dialyzátu bývá pevně stanoven, nejčastěji na 500 ml/min. Kvantitativním měřítkem účinnosti dialyzátoru je **clearance** C [10].



Obrázek 2.5 Schéma prostupu látek přes semipermeabilní membránu, převzato z [10]

Index i / o – vstup / výstup do dialyzátoru, Q_B ... průtok krve, Q_D ... průtok dialyzačního roztoku, C_B ... koncentrace látky v krvi, C_D ... koncentrace látky v dialyzačním roztoku.

Množství látky m , které přejde z krve do dialyzátu vypočítáme rozdílem množství na vstupu a výstupu [5]:

$$m = Q_{Bi} \cdot C_{Bi} - Q_{Bo} \cdot C_{Bo} = Q_{Do} \cdot C_{Do} - Q_{Di} \cdot C_{Di} \quad (2.4)$$

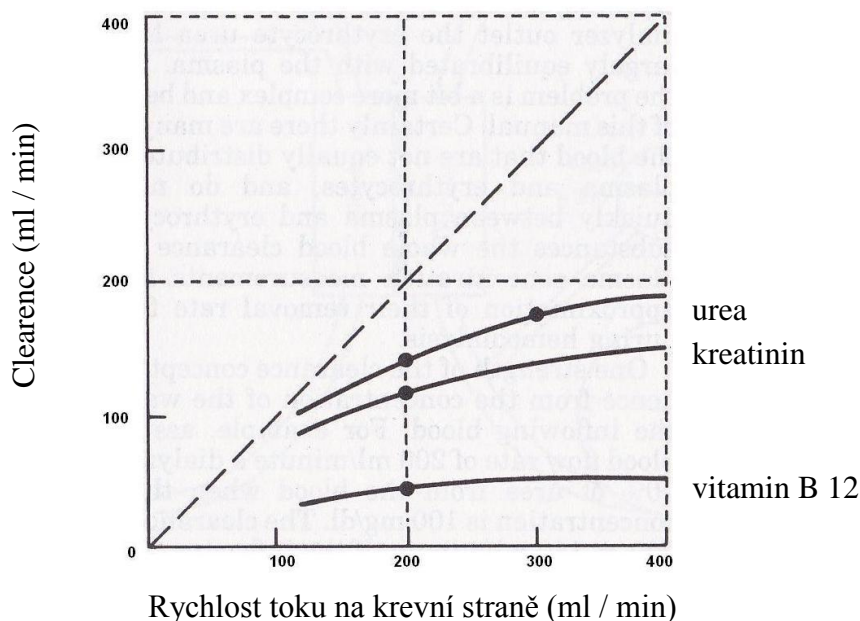
V případě, že $UTF = 0$ jsou průtoky na začátku dialyzátor stejné jako na konci $Q_{Bi} = Q_{Bo}$ a $Q_{Do} = Q_{Di}$. Vztah (2.4) pak lze zjednodušit na vztah (2.5) [5]:

$$m = Q_{Bi} (C_{Bi} - C_{Bo}) = Q_{Do} (C_{Do} - C_{Di}) \quad (2.5)$$

Clearence dialyzátoru vypočítáme jako [5]:

$$C = Q_B \frac{C_{Bi} - C_{Bo}}{C_{Bi}} [ml / min]. \quad (2.6)$$

Clearence tedy závisí na velikosti průtoku krve, průtoku dialyzátu, rozdílu koncentrace látky na vstupu a výstupu dialyzátoru. Dále na molekulové hmotnosti dané látky a jistý vliv má i účinná plocha membrány. Srovnání hodnot clearance pro ureu, kreatinin a vitamin B12 pro low-flux dialyzátor v závislosti na rychlosti toku krevní strany znázorňuje Obrázek 2.6[2].



Obrázek 2.6 Závislost clearance dialyzátoru na průtoku krve, převzato z [2]

2.4 Techniky náhrady funkce ledvin

2.4.1 Hemodialýza

Dialýza je fyzikálně-chemický proces separace látek přes semipermeabilní membránu. Pomocí hemodialýzy **HD** se odstraňují nahromaděné zplodiny látkové výměny – uremické toxiny, nadbytečná voda a upravuje se elektrolytová a acidobazická rovnováha. Dříve byla hemodialýza realizována s cuprophanovými membránami (low-flux). Molekuly se pohybovaly pouze difúzí membránou s malým podílem konvektivní složky. Tento způsob vykazoval efektivní odstraňování látek o malé molekulové hmotnosti jako je např. urea. Střední molekuly (např. β_2 -mikroglobulin) se však odstraňovaly s menší účinností. V současné době je však díky vývoji dialyzační techniky a hlavně nových high-flux membrán standard mnohem vyšší, viz kapitola 3.

High-flux hemodialýza užívá vysoce propustných, biokompatibilních membrán. Hodnoty clearance jsou dobré nejen pro malé molekuly, ale také pro středně velké molekuly. Zlepšení odstraňování středně velkých molekul je docíleno hlavně díky zařazení konvektivní složky [1].

2.4.2 Hemofiltrace

Základním podnětem pro vývoj hemofiltrace **HF** je skutečnost, že filtrace je proces fyziologičtější, více podobný reálné funkci ledviny. Přístrojová konstrukce hemofiltru se podobá hemodialýze, nepoužívá se ale dialyzační roztok. Odfiltrovanou tekutinu pacientovi nahrazuje speciální roztok., Aby byla očista krve účinná, musí být množství filtrované tekutiny dostatečně velké (asi 30l/procedura). Hemofiltrace vykazuje lepší hodnoty clearance pro středně velké molekuly. Clearance malých molekul je mnohem nižší než při samotné difuzi. Hemofiltrace je užívána nejčastěji u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Objem odstraněné a substituované tekutiny podléhá systémové kontrole daného přístroje [1], [9].

2.4.3 Hemodiafiltrace

Hemodiafiltrace **HDF** je spojením principu hemofiltrace s principu high-flux hemodialýzy. Množství filtrované tekutiny je nižší než při samotné hemofiltraci (asi 20l/procedura). Samotná HDF je dražší než klasická hemodialýza díky vysokým nákladům na substituční tekutinu. Značné zlevnění postupu přináší nejmodernější přístroje umožňující online výrobu substituční tekutiny přímo v přístroji (online HDF). Tato zařízení také poskytují online sledování clearance daných látek, sledování relativních změn objemu krve, teploty krve, teploty dialyzačního roztoku. Přístroj dokáže zajistit zpětnou vazbu a reakci podle aktuálního stavu pacienta [1], [9], [13].

3 Dialyzační membrány

Dialyzační membrána patří mezi jednu z nejdůležitějších komponent dialýzy a celé dialyzační léčby. Jde o semipermeabilní (polopropustnou) membránu, přes kterou přestupují molekuly do hmotnosti okolo 58 000 Da, plazmatická voda a krystaloidy (fyziologické roztoky vhodné pro náhradu krevního volumu). Hraniční je albumin o hmotnosti 63 000 Da, který by neměl prostoupit přes žádnou dialyzační membránu. Z toho vyplývá, že bílkoviny ani jiné makromolekulární látky např. krevní elementy přestupovat nesmí. Mezi rozhodující znaky pro použití membrány patří její propustnost, tloušťka, velikost pórů i geometrický rozměr. Velmi důležitým parametrem při hodnocení dialyzačních membrán je míra jejich biokompatibility [10].

3.1 Historický vývoj membrán

Při první úspěšné dialýze (1945, Kolff a Berk) byla jako dialyzační membrána použita jednoduchá celofánová trubice. Dialyzátor byl ve tvaru „rotačního bubnu“. V průběhu 60. let 20. století se ustálily dvě různé formy dialyzačních membrán – **ploché membrány** a **kapilární membrány**. Hlavní výhodou kapilární konstrukce membrány je, že při průtoku tekutiny je membrána stabilní a nemůže se deformovat, tvoří sama sobě oporou. Paralelně spojené ploché membrány vyžadují konstrukčně náročnější kontrolu, aby se vlivem průtoku nebo transmembránového tlaku nedeformovaly nebo k sobě nepřilnuly. Vyšší nákladnost konstrukční výroby vedla k tomu, že ploché membrány z trhu již prakticky vymizely [1].

3.2 Membránové materiály

Podle základní chemické struktury můžeme rozlišovat membrány přírodního charakteru, odvozené od celulózy (dnes používané pouze výjimečně) a membrány syntetické [10].

3.2.1 Membrány odvozené od celulózy

Celulóza je v přírodě nejrozšířenějším polymerem, nachází se v bavlně, dřevě a rostlinách. Chemickou strukturu celulózy tvoří dvě molekuly glukózy spojené $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukosidovou vazbou.

Pro účely výroby dialyzačních membrán odvozených od celulózy se používá *regenerovaná celulóza*, tj. chemicky zpracovaná. Výsledný materiál je velmi pevný a porézní. Póry jsou malé, což dovoluje velkou rychlost difuze malých látek.

Pokud je **celulóza nesubstituovaná**, tj. jsou ponechány hydroxylové skupiny, zachovávají se všechny příznivé vlastnosti celulózy – pevnost, hydrofilita, propustnost, nevýhodou je však menší biokompatibilita. Nesubstituovaná celulóza je použitelná pouze pro výrobu low-flux membrán. Mezi nejznámější reprezentanty dialyzačních membrán

z nesubstiované regenerované celulózy patří Cuprophan. Cuprophan byl používán od počátku chronické dialýzy až po rok 1990.

Ve snaze zlepšit biokompatibilitu membrán se začaly vyrábět dialyzační membrány ze **substituované celulózy**. Substituce hydroxylové skupiny se nejdříve prováděla acetátovými skupinami (jednou až třemi), později di-etyl-amino-etylovými (DEAE) skupinami. Mezi nejznámější zástupce této skupiny patří low-flux membrána Hemophan [11].

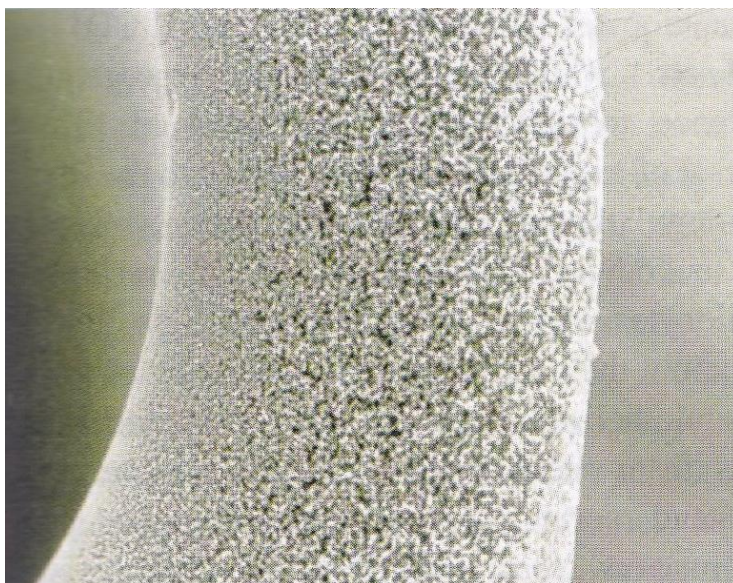
3.2.2 Syntetické membrány

Syntetické membrány reprezentují v současné době nejvíce rozšířené membrány a jejich rozšíření na trhu stále roste. Nejvýznamnějšími zástupci jsou polysulfon (PS), polyethersulfon (PES), polyakrylonitril (PAN), polyamid, polymethylmetakrylát (PMMA) aj. Zásadním odlišením od membrán odvozených od celulózy je, že neobsahují velké množství volných hydroxylových skupin [11].

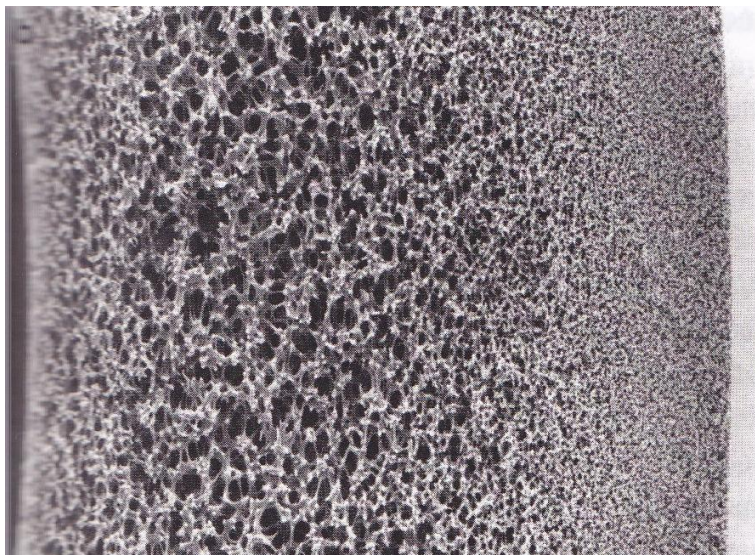
Od 80. let dvacátého století bylo cílem vývoje membrán vytvořit membránový materiál, který by zaručoval vysokou biokompatibilitu a samozřejmě jednotnou kvalitu při přesně daných podmínkách výroby.

V roce 1980 se podařilo německému koncernu Fresenius vyvinout polysulfonovou membránu, která tyto předpoklady splňovala. Relativně malá tloušťka membrány 40 μm , vysoká poróznost a asymetrická, mikoretikulární (mikroporézní) struktura zajišťovala vysokou propustnost membrány a v procesu dialýzy vysoké hodnoty clearance, viz Obrázek 3.1 **A** – *Fresenius Polysulfon[®] PS600*. Při vývoji nových membrán pro dialýzu je kladena mimořádná pozornost hlavně na biokompatibilitu, (viz kapitola 3.3.2), syntetická polysulfonová membrána splnila předpoklad nízké schopnosti aktivovat komplement, tzn. vyšší biokompatibilitu [3]. O tři roky později byla vynalezena polyethersulfonová membrána DIAPES, symetrické, mikoretikulární, třívrstvé struktury s tloušťkou stěny 35 μm , viz Obrázek 3.1 **B** – *DIAPES[®] HF800*. Polyamix je membrána vzniklá z polyethersulfonu a polyamidu, má asymetrickou, makoretikulární (makroporézní) strukturu a tloušťku stěny 50 μm , viz Obrázek 3.1 **C** – *Polyamix[®] [1]*.

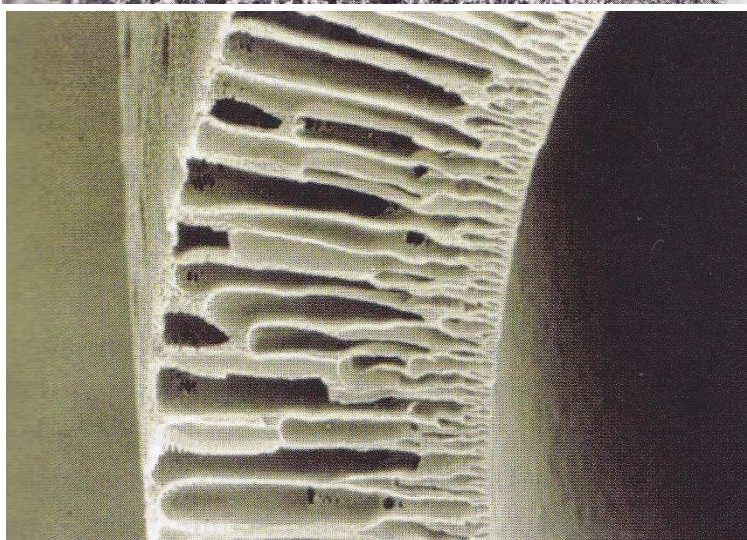
A



B



C



Obrázek 3.1 Srovnání průřezu tří různých syntetických high-flux membrán na snímku z elektronového mikroskopu, převzato z [1]

Syntetické membrány vytěsnily od roku 1990 membrány z nesubstituované celulózy, a lze předpokládat, že v budoucnu vytlačí i stále se užívané membrány ze substituované celulózy. [1].

Většina syntetických membrán se řadí mezi high-flux, některé však mohou být koncipovány i jako low-flux. Membrány jako je polyakrylonitril a polyetersulfon, které jsou vysoce propustné pro vodu, zvýšily permeabilitu i pro vitamin B₁₂. Dále se také ukázalo, že tyto membrány, obzvláště polysulfonová, propouští β 2-mikroglobulin lépe než celulózová membrána [11].

Obecně vzato, syntetické membrány vykazují lepší schopnost odstraňovat látky o molekulové hmotnosti nad 1 000 Da (na rozdíl od low-flux membrán), tím jsou i více propustné pro více druhů uremických toxinů. Poskytují adekvátní léčbu akutního selhání ledvin, které bylo způsobeno např. vlivem multiorgánového selhání nebo otravy. V krevním oběhu se v takových případech objevují toxické látky i nad 20 000 Da [1].

V oblasti chronické dialýzy stále probíhají studie, zda je rozdíl při dlouhodobém užití high/low-flux membrán. První randomizovaná klinická studie (zařazující pacienty) v této oblasti se uskutečnila v USA a nese označení HEMO. Žádné zásadní rozdíly mezi léčbou low- a high-flux membránami nalezeny nebyly. Studie v této oblasti probíhají i v Evropě a jsou zaštiťovány MPO (Ministerstvem průmyslu a obchodu) [1].

3.3 Klasifikace dialyzačních membrán

Dialyzační membrány můžeme klasifikovat podle jejich *propustnosti* a *biokompatibility*.

3.3.1 Propustnost membrán

Různé dialyzační membrány mají různou velikost pórů. V závislosti na velikosti pórů propouští látky o různé molekulové hmotnosti (malé, střední nebo velké, viz kapitola 2.1). Velikost pórů může být posuzována podle koeficientu ultrafiltrace K_{uf} – propustnosti vody a propustnosti proteinů, která je indikována pomocí clearance β_2 -mikroglobulinu a ztrátami albuminu. Membrány s nejmenšími póry nazýváme low-flux LF, membrány s většími póry high-flux HF, podle toho se pak rozdělujeme i samotné dialyzátory.

Označení low-flux a high-flux patří mezi základní rozdělení propustnosti membrán. Toto rozdělení může být doplněno ještě o membrány mid-flux MF a super-flux SF. V následující tabulce (Tabulka 3.1) jsou znázorněny parametry pro LF a HF membrány. Mid-flux membrány by se nacházely mezi LF a HF s tím, že vykazují jako LF nulové ztráty albuminu po 4 hodinách léčby. Hodnoty super-flux membrány jsou podobné jako pro HF membrány, mají však vyšší albuminové ztráty než 2 g/4 hod léčby. [1].

Tabulka 3.1 Rozdělení dialyzátorů založené na propustnosti dialyzační membrány [1]

		<i>Low-flux</i>	<i>High-flux</i>
K_{uf}	[ml/h/mm Hg]	< 10	> 20
Clearance β_2 -mikroglobulinu	[ml/min]	< 10	> 20
Ztráty albuminu za 4 hodiny léčby	[g]	0	< 2
Vhodný způsob léčby		HD	HD, HF, HDF

HD – hemodialýza, HF – hemofiltrace, HDF - hemodiafiltrace

3.3.2 Biokompatibilita membrán

Součástí imunitní obrany organismu je komplementový systém. Komplementový systém patří mezi hlavní mediátory akutní zánětlivé odpovědi, rozpoznává a eliminuje cizí substance v těle. Tvoří ho plasmatické proteiny a buněčné receptory. Aktivace komplementu může probíhat buď klasickou, nebo alternativní cestou. Klasickou cestou zahajují aktivaci imunitní komplexu. V případě alternativní cesty jsou spouštěči bakterie, houby, endotoxiny

a další podněty. Biomateriály řadíme do skupiny především alternativních spouštěčů komplementu [11].

Souvislosti mezi biokompatibilitou dialyzačních membrán a aktivací komplementu jsou studovány od 70. let dvacátého století na podnět prací Craddocka a jeho spolupracovníků. Craddock jako první spojil leukopenii (pokles počtu bílých krvinek) při hemodialýze s tím, že právě celofánová membrána komplement aktivuje. Na základě dalších studií začal být komplement spojován i s řadou jiných negativních příznaků (např. hypoxémií, aj.).

Z dialyzačních membrán je Cuprophan řazen mezi silné aktivátory komplementu. Dříve byl jedním z nejpoužívanějších materiálů, aktivace komplementu je tedy nejlépe popsána pro tuto membránu.

Aktivace komplementu v důsledku kontaktu krve s dialyzační membránou způsobuje změny v krvi i celém organismu. Změny sledujeme na základě nálezů v krevní plazmě. Není přesně známý důvod, proč membrány komplement aktivují. Bylo ale zjištěno, že látka zymosan (polysacharidové povahy) je silným aktivátorem komplementu, zymosan má na svém povrchu velké množství hydroxylových skupin. Na základě tohoto zjištění se začaly vyrábět substituované celulózy membrány, kde 70-99% hydroxylových skupin nahrazovali acetátovými skupinami. Byly demonstrovány výrazně lepší výsledky než u celulózy nesubstituované. Dalším používaným substituentem je di-etyl-amino-etylén (DEAE) u membrány s firemním názvem Hemophan.

Syntetické membrány neobsahují velké množství volných hydroxylových skupin, jsou proto menšími aktivátory komplementu než membrány z regenerované celulózy. Většinou tomu tak je i ve srovnání s membránami ze substituované celulózy [11].

Tabulka 3.1 Rozdělení dialyzačních membrán podle míry biokompatibility [1]

Nesubstituovaná celulóza Nízká biokompatibilita	Substituovaná celulóza Větší biokompatibilita	Syntetické membrány Biokompatibilní
Cuprophan LF	Hemophan LF	Polysulfon <ul style="list-style-type: none"> • Fresenius Polysulfon LF/HF Polyethersulfon <ul style="list-style-type: none"> • DIAPES LF, MF, HF • Polyamix LF, HF Polymetylmetakrylát LF, MF, HF, SF

LF low-flux; MF mid-flux; HF high-flux; SF super-flux

Tabulka 3.1 uvádí nejvýznamnější zástupce dialyzačních membrán, rozdělených do tří skupin podle biokompatibility. Nízkou biokompatibilitu dialyzačních membrán vyrobených z nesubstituované celulózy předpověděl i výzkum US Renal Data System publikovaný v roce 1996. Jeho závěr zněl, že mortalita pacientů léčených těmito membránami je o 20 % vyšší ve srovnání s membránami jinými. Skutečný dopad biokompatibility dialyzačních membrán na mortalitu dlouhodobě léčených pacientů však nebyl doposud přesně vyhodnocen žádnou prospektivní studií s dostatečnou biostatistickou silou [1].

4 Návrh experimentální aparatury

Jedním z bodů práce je navrhnout blokové schéma a podle něj sestavit aparaturu na experimentální měření propustnosti dialyzačních membrán. Následující kapitola se zabývá návrhem aparatury, popisem jednotlivých komponent a výběrem měřicího režimu, ve kterém bude experimentální aparatura spuštěna.

4.1 Základní koncepce

Experimentální aparatura slouží jako velmi zjednodušený model deskového dialyzačního přístroje. Tak jako u reálného dialyzátoru i zde jsou dvě stěžejní části – krevní okruh a dialyzační okruh. Těžištěm aparatury je speciální měřicí cela, do níž se uzavírá testovaná membrána o malé ploše (asi 50 cm²). Cela má průtočný charakter.

Obíhajícími tekutinami není reálná krev ani reálný dialyzát, ale roztoky simulující obě tyto tekutiny. Krev je složitá viskózní kapalina složená z plazmy a krevních elementů. Pro sledování čistého prostupu sledovaných látek, není třeba simulace chemického ani strukturního složení. V rámci experimentu bude krev zastupovat roztok destilované vody a uremických toxinů, pracovně nazývaný jako vodný roztok krve. Roztok bude obsahovat dva nejhlavnější uremické toxiny: urea a kreatinin. Dialyzát bude simulován destilovanou vodou.

4.1.1 Možné měřicí režimy

Existují dva možné způsoby zapojení aparatury, podle kterých se odvíjí způsob měření – *nestacionární* a *stacionární*.

Stacionární režim – diskontinuální průběh měření znamená, že okruh, ve kterém dialýza probíhá, není uzavřen. Roztok z krevní vsádky je čerpán do měřicí cely, z měřicí cely do odpadu. Dialyzát je čerpán z dialyzátové vsádky a po průchodu měřicí celou proudí také do odpadu. Experimentální aparaturu na této bázi znázorňuje blokové schéma, viz Obrázek 4.4. Ve stacionárním režimu probíhá i reálná dialýza v klinické praxi – krev proudí z krevní strany (z pacienta) do dialyzátoru a z něj očištěná zpět do pacienta. Dialyzát proudí dialyzátorem protiproudě, vzhledem k proudění krve, se po průchodu dialyzátorem čerpá do odpadu.

Nestacionární režim, popisuje zapojení aparatury, kdy dialyzátový i krevní okruh jsou uzavřeny. Roztok z krevní vsádky je čerpán do měřicí cely a z ní zpět do krevní vsádky. Dialyzát je čerpán z dialyzátové vsádky do měřicí cely a poté zpět do dialyzátové vsádky. Principiální blokové schéma aparatury pro případ nestacionárního způsobu měření je znázorněno na Obrázek 4.5. Před spuštěním aparatury je na krevní straně maximální koncentrace sledovaných látek a na dialyzátové straně je na začátku koncentrace sledovaných látek nulová.

Jednotlivé prvky schématu jako regulace teploty, čerpání čerpadlem a měření průtoku jsou pro oba režimy stejné a podrobněji je rozebírá navazující podkapitola 4.2.

4.1.2 Výběr měřicího režimu pro realizaci experimentální aparatury

Propustnost membrány pro sledované látky by byla v obou případech vypočítaná z koncentrací odebraných vzorků v daných časových intervalech v průběhu měření a to jak ze vzorků z krevní, tak ze vzorků z dialyzátové strany. Místo odebírání vzorků u nestacionárního a stacionárního způsobu měření je rozdílné a tvoří další z rozdílů mezi blokovým schématem stacionárního a nestacionárního způsobu měření.

Ve *stacionárním režimu měření* se vzorky odebírají na vstupech a výstupech krevní a dialyzátové strany. Z roztoku simulujícího krev, čerpaného z krevní vsádky do měřicí cely a jejím průchodem jsou sledované uremické toxiny postupně odstraňovány. V dialyzátové vsádce je nulová koncentrace sledovaných látek. Čerpáním tohoto dialyzátu do měřicí cely se udržuje koncentrační gradient. Sledované látky jsou z krevní strany kontinuálně odstraňovány. Po průchodu měřicí celou proudí krevní i dialyzátová strana do odpadu.

V případě *nestacionárního režimu měření* jsou vzorky odebírány po určitých časových intervalech z krevní a dialyzátové vsádky. Koncentrace sledovaných látek v dialyzátové vsádce postupně vzrůstá, zatímco v krevní vsádce koncentrace úměrně klesá. Přestup látek přes dialyzační membránu z krevní do dialyzátové strany probíhá, dokud se koncentrace na obou stranách nevyrovnají.

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že stacionární režim napodobuje průběh při reálné dialýze. Režim splňuje požadavek postupného snižování nefyziologické hodnoty koncentrace uremických toxinů v krvi na hodnotu fyziologickou. Splnění cíle celého experimentu, stanovení propustnosti použité dialyzační membrány pro dané uremické toxiny, je však výhodnější prakticky realizovat nestacionárním způsobem zapojení, kde se koncentrace v obou vsádkách po čase vyrovnají. Praktická část této bakalářské práce bude věnovaná pouze nestacionárnímu způsobu měření.

Koncentrace odebraných vzorků je získána proměřením vzorků ve spektrofotometru. Tyto vzorky je nutno analyzovat s potřebnou přesností. Na základě příslušných výpočtových vztahů se z naměřených koncentrací jednotlivých látek stanovuje propustnost membrány pro dané látky a usuzuje se na účinnost membrány. Princip analýzy vzorků popisuje kapitola 5.

4.2 Komponenty potřebné pro sestavení aparatury

- 2 x závěsný oběhový termostat Julabo ED-5M,
- 2 x nerezová vsádka o obsahu 5 l,
- 2 x rotometr – skleněný plovákový průtokoměr,
- 2 x šroubovací škrticí ventil,
- digitální teploměr + 2 x termočláňková ponorná sonda,
- měřicí cely:
 - o membránová opěrka (51,10 x 84,50 mm),
 - o plochá dialyzační membrána (rozměr alespoň 70 x 110 mm),
 - o spojovací šrouby,
 - o hadičky na kontrolu TMP,
- propojovací hadičky PVC vnitřní průměr 6-8 mm, silikonové spojovací hadičky.

4.2.1 Popis jednotlivých komponent

V čase $t = 0\text{ s}$: **krevní vsádka** obsahuje 5 l vodného roztoku simulujícího krev, **dialyzátová vsádka** 5 l destilované vody. Koncentrace sledovaných látek před spuštěním aparatury je na krevní straně maximální, na dialyzátové nulová.

Oběhový termostat zahrnuje čerpadlo, topnou spirálu, mikroprocesor, ovládací panel a LED displej. Termostat je postaven na nerezové vsádce. Po spuštění zde zajišťuje konstantní teplotu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dobré promíchávání, tím i homogenitu obsahu vsádky. Aktuální teplotu obsahu vsádky zobrazuje LED displej s rozlišením $0,1^{\circ}\text{C}$. Stálost teplotních podmínek a vyhřívání reguluje mikroprocesor s teplotní stabilitou $0,03^{\circ}\text{C}$. (Pro případ, že by se obsah přehříval, lze připojit chladicí okruh). **Čerpací výkon** čerpadla oběhového termostatu je pro měření nastaven následovně: 80% výkonu směřuje do externího okruhu, 20 % do interního (cirkulace ve vsádce). Z celkového čerpacího výkonu 15 l/min (při kterém je max. tlak 340 mbar) se do externího okruhu čerpá roztok rychlostí 12 l/min a v rámci interního okruhu vsádky rychlostí 3 l/min [15]. Interní cirkulace splňuje požadavek stálého promíchávání obsahu vsádky a zároveň je cirkulace taková, že se do obsahu vsádky a tím i do celého okruhu nedostávají nežádoucí vzduchové bubliny. Počáteční hladina v obou vsádkách je vyznačena ryskou uvnitř nádoby. Při dlouhých měřeních se může projevit drobné odpařování roztoku, čímž by ve výsledku mohly vznikat nepřesnosti v získaných výsledcích. Ryska poslouží pro kontrolu nejen případného odparu tekutiny, ale i ultrafiltrace v případě nenulového TMP. Čerpadlo zajišťuje kontinuální a reprodukovatelný tok, s dostatečným průtokem v rámci celého okruhu. Zajištěna je i dostatečná rezerva pro práci v oblasti s vysokou průtočnou rychlostí.

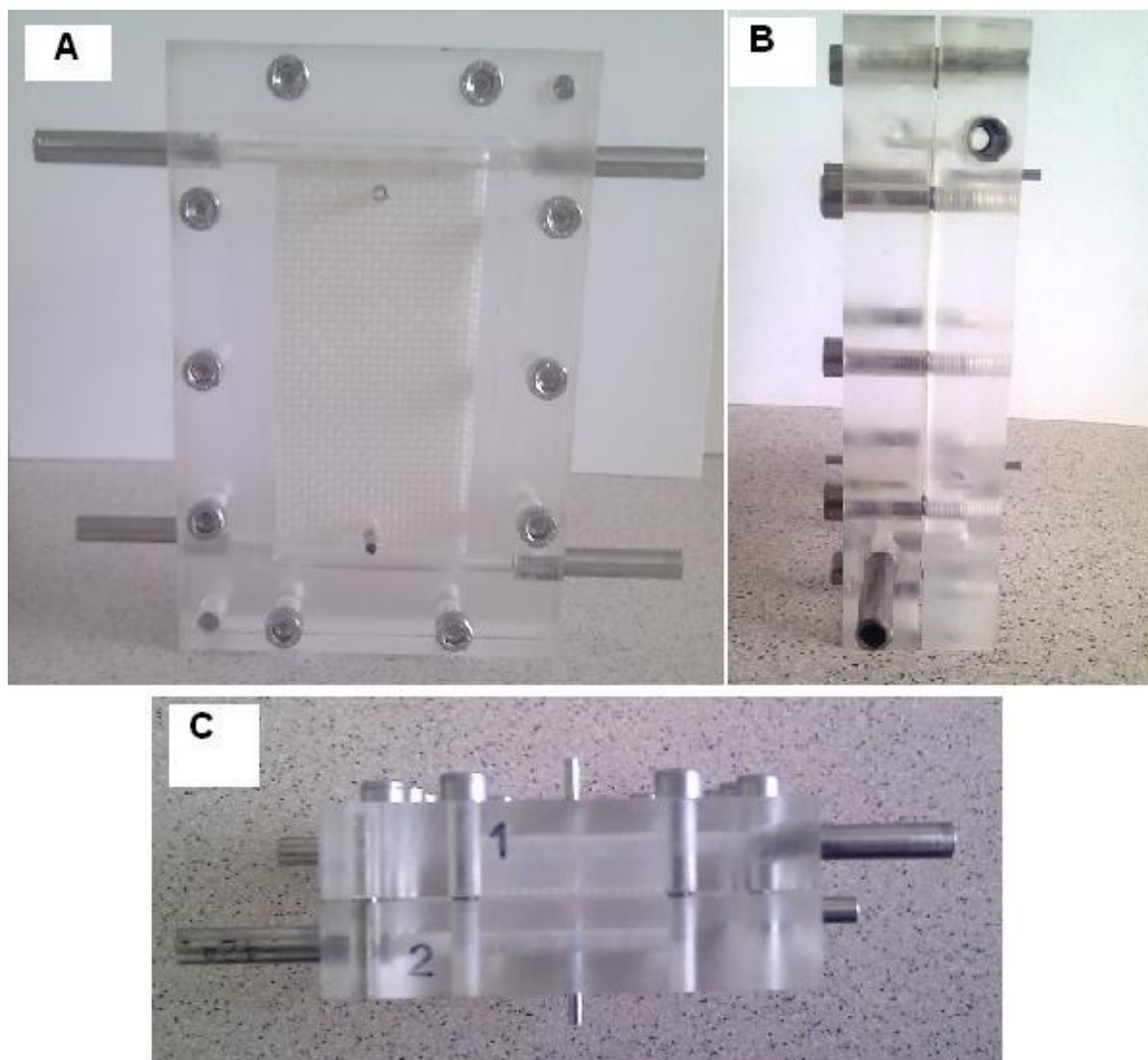


Obrázek 4.1 Oběhový termostat JulaboED- 5M, převzato z [15]

Z čerpadla proudí roztok do rotametru – plovákového průtokoměru, určeného pro sledování rychlosti průtoku. Použitý **laboratorní rotametr** je ze skla, konstruovaný na max. průtok 400 ml/min a teplotu vody 37°C . Průhlednost rotametru umožní detekci

případných vzduchových bublin. K regulaci rychlosti průtoku rotametrem slouží předřazený otočný škrtkový ventil.

Z rotometru proudí roztok do měřicí cely. **Měřicí cely** se skládá ze dvou totožných průhledných plastových desek s vybráním, dialyzační membrány a membránové opěrky. Desky jsou umístěny zrcadlově proti sobě a jsou staženy šrouby. Mezi deskami je dialyzační membrána, kterou z obou stran podepírá membránová opěrka. Upevnění a utěsnění membrány, tím i celé měřicí cely zajišťuje sešroubování desek, viz Obrázek 4.2, schematické znázornění detailu měřicí cely z bočního pohledu viz Obrázek 4.6.

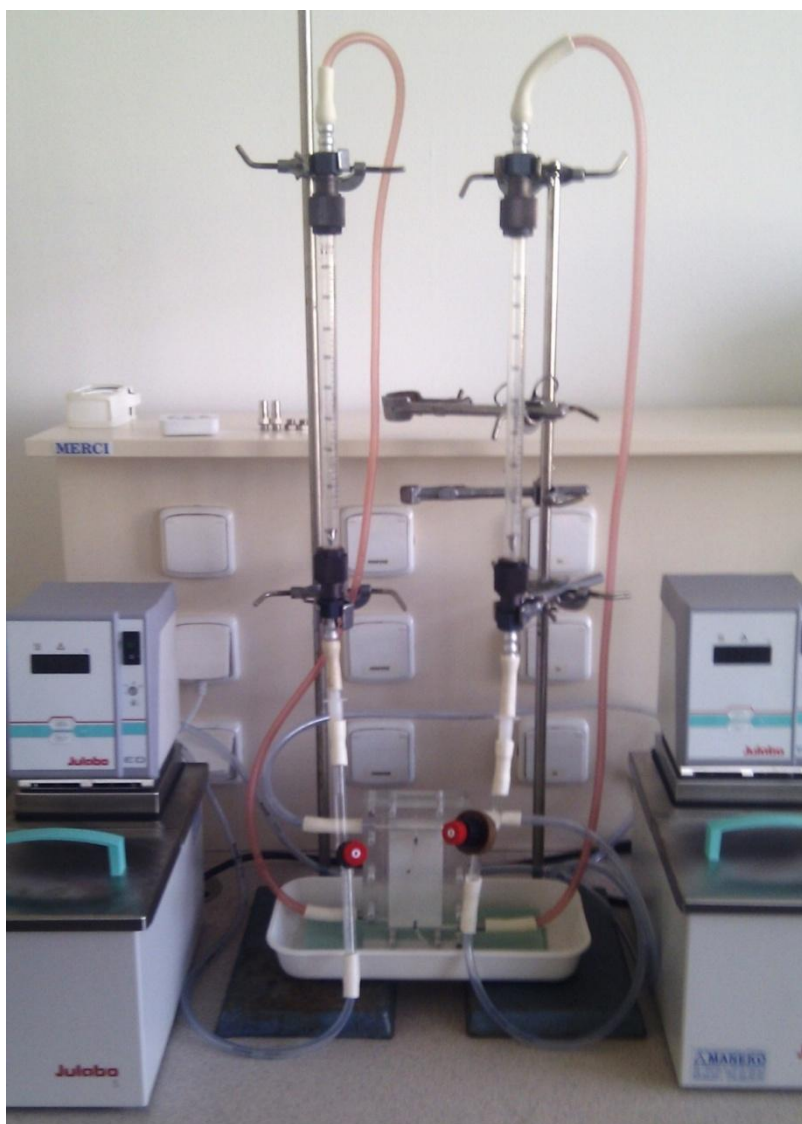


Obrázek 4.2 Měřicí cely z čelního, bočního a horního pohledu

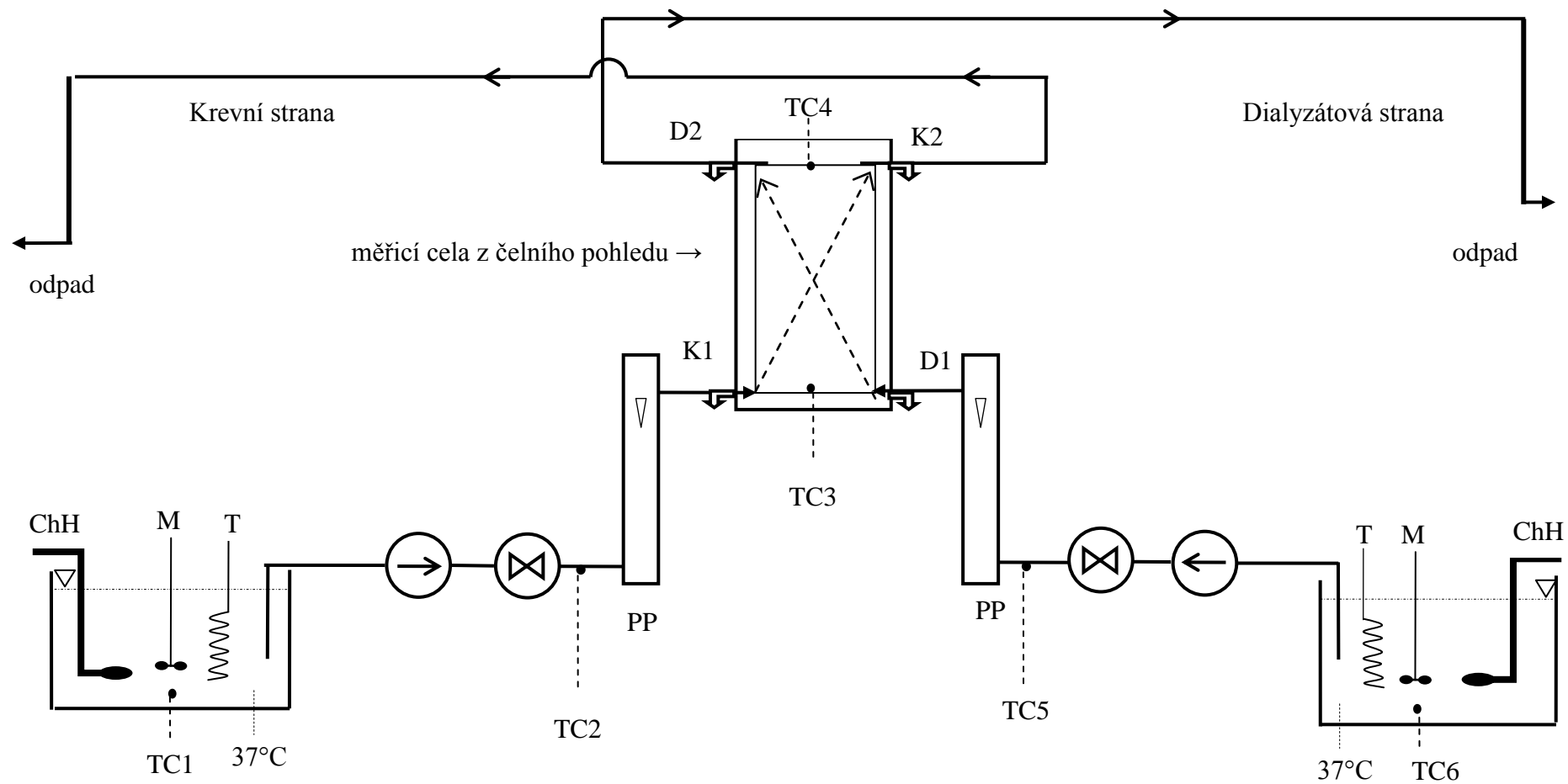
Krevní strana aparatury je symetrická s dialyzátovou. Diferenci teploty mezi vsádkou o konstantní teplotě 37 °C a měřicí celou bude měřena termočláňkovými sondami, ve schématu značenými zkratkou TC. Termočláňky jsou výhodné hlavně díky malým rozměrům sondy, v průměru 1,5 mm. TC1 je umístěn uvnitř krevní vsádky, TC2 v dialyzátovém vstupu, co nejbližší membráně. Druhý způsob měření teploty by mohl být realizován pomocí termistoru, odporového teploměru. Termistorové snímače využívají změny

elektrického odporu materiálu v závislosti na jeho teplotě. Hlavní nevýhodou termistoru pro užití v naší aparatuře je však větší průměr sondy.

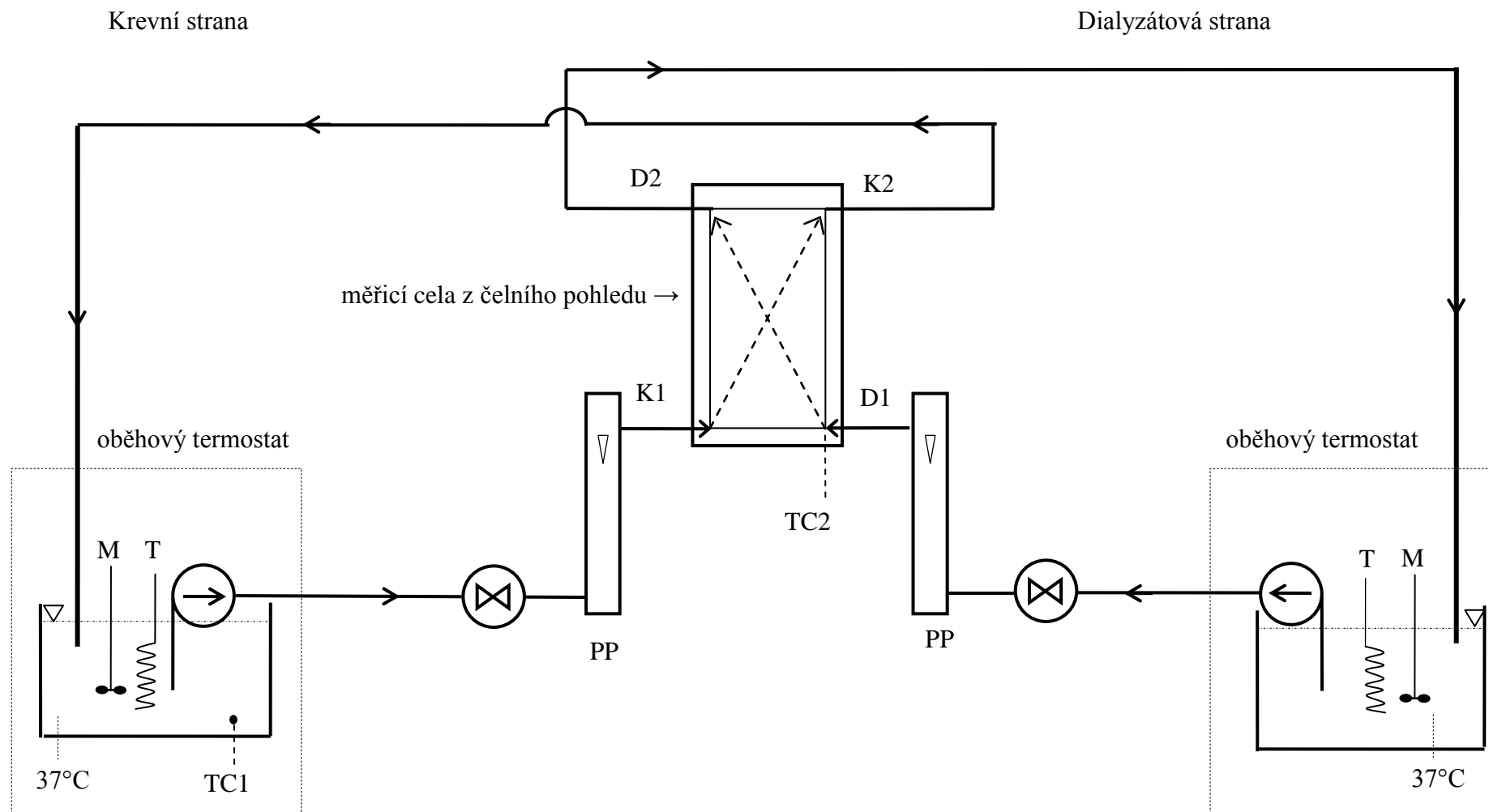
Pokud v měřicí cele proudí krev a dialyzát proti sobě – protiproudně, dochází k účinnější výměně (ve srovnání se souproudelem), tento způsob je užívaný při dialýze v praxi. Z praktického hlediska je však výhodnější souproude proudění, zajišťuje to nulový transmembránový tlak TMP v každém místě membrány. Tlakové poměry mohou být v praxi sledovány pomocí průhledných hadiček vyvedených z měřicí cely nerezovými výstupy. Pokud bude vodní sloupec na krevní i dialyzátové straně na vstupech i výstupech stejně vysoký, je $TMP = 0$ a sledujeme průchod látek přes membránu čistou difúzí. Pokud by byl $TMP > 0$, k difúzi se přidá konvektivní složka a membránou prochází voda – nastává ultrafiltrace. V klinické praxi se využívá pouze většího tlaku na krevní straně k řízené ultrafiltraci. Znázornění realizace měření tlaku na cele viz Obrázek 4.6 (hadičky na sledování TMP). Výška Δh podává informaci o velikosti průtočného odporu.



Obrázek 4.3 Sestavená aparatura (bez termočlánekových sond)









Obrázek 4.4 Principiální blokové schéma aparatury – stacionární způsob měření, vysvětlivky viz Tabulka 4.1 a Tabulka 4.2



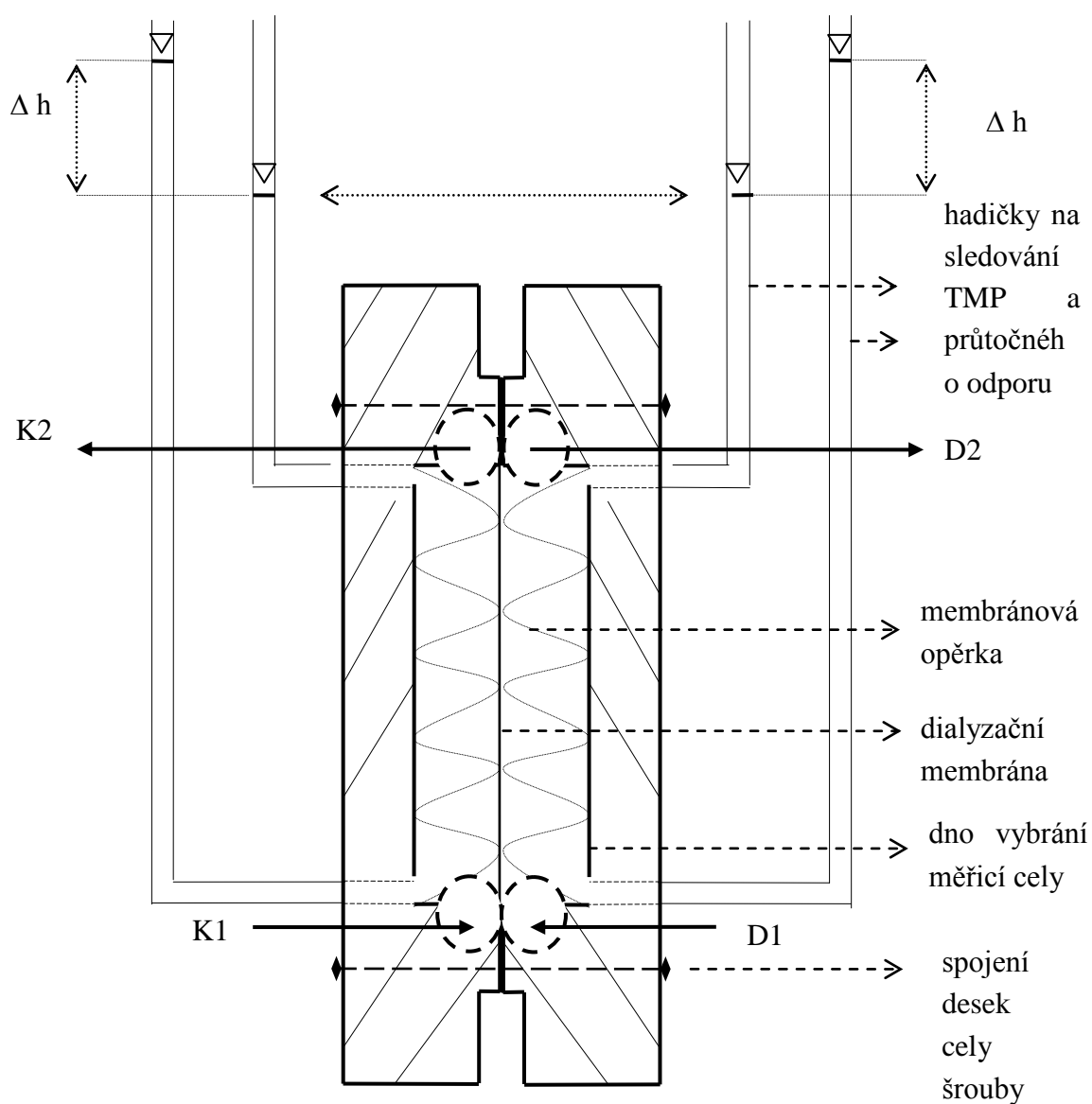
Obrázek 4.5 Principiální blokové schéma aparatury – nestacionární způsob měření, vysvětlivky viz Tabulka 4.1 a Tabulka 4.2

Tabulka 4.1 *Legenda použitých symbolů pro stacionární i nestacionární způsob měření*

	škrtkící ventil
	čerpadlo
	termočlánek
	volná hladina
	místo odběru vzorků na K1, K2, D1, D2 pro stanovení clearance – při stacionárním způsobu měření
	u nestacionárního způsobu měření se vzorky odebírají z vsádky po určitých časových intervalech v průběhu měření
	integrovaný vodoměr – sumarizující daný průtok pro případ nestacionárního způsobu měření

Tabulka 4.2 *Legenda použitých zkratk*

ChH	chladicí had	PP	plovákový průtokoměr - rotametr
M	míchadlo	MC	měřicí cela
TS	topná spirála	TC 1-6	termočlánek 1-6
K1	vstup – krevní strana	D1	vstup – dialyzátová strana
K2	výstup – krevní strana	D2	výstup – dialyzátová strana



K1 – vstup do cely z krevní strany,

K2 – výstup z cely z krevní strany

D1 – vstup do cely z dialyzátové strany,

D2 – výstup z cely z dialyzátové strany

Rozměry vnitřního vybrání cely (v x š x h): (85,40 x 51,10 x 1,65) cm.

Obrázek 4.6 Měřicí cely z bočního profilu, vysvětlivky viz Tabulka 4.1 a Tabulka 4.2

5 Příprava na měření

V předchozí kapitole je zmíněno, že pro experimentální měření je vhodné mít aparaturu sestavenou pro nestacionární způsob měření, kde jsou v daných časových intervalech odebírány z krevní i dialyzátové vsádky vzorky. Zjištění koncentrace odebraných vzorků je klíčová pro matematickou analýzu procesu prostupu látek přes membránu. Následující text se zabývá způsoby analýzy odebraných vzorků a odvozením výpočtových vztahů pro zpracování zjištěných koncentrací odebraných vzorků.

5.1 Komponenty použité pro analýzu

- látky na vodný roztok krve, čistota látek p.a.:
 - o urea ($M = 60,06 \text{ g/mol}$),
 - o kreatinin ($M = 113,12 \text{ g/mol}$),
- BIO-LA-TEST[®] na stanovování koncentrací daných látek:
 - o BLT urea liquid 250,
 - o BLT creatinin liquid 500,
- spektrofotometr CE 2502 Spektrofotometr BIO-QUEST s vestavěnou tiskárnou,
- kyvety 1 cm,
- mikropipety na objem 10 μl a 50 μl , pipeta na 1 ml + příslušné špičky,
- digitální váhy,
- vyhřívací blok na zkumavky,
- plastové zkumavky (objem 1,5 ml).

5.2 Příprava krevní a dialyzátové vsádky

Do obou vsádek je odměřeno přesně 5 litrů destilované vody, tzn. 5 litrů do krevní vsádky a 5 litrů do dialyzátové vsádky. V obou vsádkách se změří výška hladiny vzhledem k vrchnímu okraji nádoby posuvným měřítkem. Hladina se vyznačí v obou nádobách ryskou (např. nesmývatelným fixem). Poté mohou být jednotlivé komponenty aparatury propojeny hadičkami a aparatura spuštěna. Toto prvotní spuštění slouží k vyhřátí obou vsádek na teplotu 37 °C, kontrolu těsnosti všech spojů a měřicí cely, nastavení průtokoměrů na požadovaný průtok a odstranění vzduchových bublin z měřicí cely. Po vyhřátí vsádek termostaty vypneme. Vypínání i zapínání musí probíhat souběžně, aby nedošlo k prodlevě na jedné straně a tím případné ultrafiltraci vody z jednoho okruhu do druhého. Po vypnutí zůstane okruh zavodněný, ve vsádkách nepatrně klesne hladina. Před samotným měřením se proto vypustí okruh zpět do vsádek. Vypuštění lze realizovat jednoduše tím, že se odpojí hadičky z vrchního ústí obou průtokoměrů (opět souběžně). V okruhu tak zůstane pouze minimální množství vody a to pouze v hadičkách na výstupech z měřicí cely a v měřicí cele. Hladina ve vsádkách je tak na původní prakticky hodnotě, což lze potvrdit i přeměřením posuvným měřítkem. Tento postup musí předcházet každé měření s aparaturou.

5.3 Vytvoření vodného roztoku krve

Do krevní vsádky se přidává příslušné množství jedné sledované látky. V případě současného sledovaného prostupu obou látek zároveň, přidávají se příslušné koncentrace obou látek – urey i kreatininu. Podrobnější rozbor užití jednotlivých látek viz kapitola 6.2, zabývající se konkrétní realizací měření.

Zvolení počáteční koncentrace dané látky ve vodném roztoku: Bio-La-Testy mají určité pracovní rozsahy, ve kterých je možné analyzovat odebraný vzorek, aniž by se musel před analýzou ředit destilovanou vodou.

BLT urea liquid 250: pracovní rozsah: 0,4 – 50 mmol/l, mez detekce: 0,12 mmol/l, viz návod Příloha B.

BLT creatinin liquid 500: pracovní rozsah: 7,09 – 3000 $\mu\text{mol/l}$, mez detekce: 2,33 $\mu\text{mol/l}$, viz návod Příloha C.

Od hodnot pracovních rozsahů se odvíjí i množství látek, které bude v obsahu rozmícháno. Koncentrace získaná teoretickým výpočtem bude brána pouze jako orientační. Jako reálná hodnota bude považována ta, která vznikne stanovením vzorku v čase $t = 0 \text{ s}$, tzn. před spuštěním aparatury. Hmotnost látky se vypočítá podle následujících vztahů [17]:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m}{M}}{V} = \frac{m}{M \cdot V}, \quad (5.1)$$

$$m = c \cdot M \cdot V, \quad (5.2)$$

kde M je molární hmotnost, c koncentrace, m hmotnost, V objem roztoku.

Tabulka 5.1 Souhrnné údaje o vodném roztoku krve

		Urea	Kreatinin
Molární hmotnost	M	60,06 g/mol	113,12 g/mol
Objem roztoku	V	5 l	5 l
Požadovaná koncentrace	c	40 mmol/l = $40 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$	2700 $\mu\text{mol/l}$ = $2,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$
Potřebné množství látky	m	12,012 g	1,527 g

5.4 Analýza vzorků

Močovina je produktem metabolismu bílkovin, kreatinin svalového kreatinu. Souhrnně patří tyto látky mezi dusíkaté látky nebílkovinného charakteru. Pojem nebílkovinné dusíkaté látky (NPN, non-protein nitrogen) zahrnuje dusíkaté látky, které zbyly v plazmě nebo jiných biologických tekutinách po deproteinaci. Z lidského organismu jsou vylučovány močí, účinnost odstraňování lze posoudit podle hodnoty glomerulární filtrace [16].

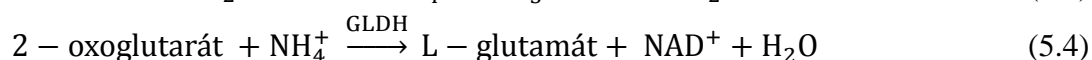
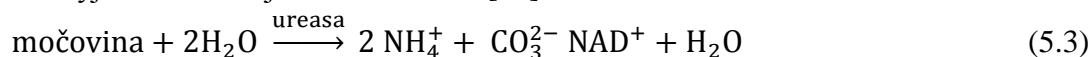
5.4.1 Močovina

Močovina (urea, diamid kyseliny uhličité) je konečným metabolitem dusíku bílkovin (aminokyselin) a vzniká v játrech. Močovina je bílá krystalická látka, ve vodě dobře rozpustná

a snadno difundující, její koncentrace je ve všech biologických tekutinách téměř stejná. V klinické praxi se využívá stanovení močoviny v séru pro diagnostiku ledvinových chorob a sledování jejich průběhu. Stanovení v moči slouží k odhadu stupně katabolismu bílkovin u kriticky nemocných pacientů či sledování bilance dusíku. Referenční hodnoty osob středního věku je 2,0 – 8,3 mmol/l, hodnoty u dětí jsou nižší [17].

5.4.2 Stanovení koncentrace močoviny v odebraném vzorku (Bio-La Test)

Princip metody je založen na uvolnění NH_4^+ z močoviny ureasou. Uvolněný amonný kation se v přítomnosti glutamátdehydrogenasy GLDH (enzym oxidační deaminace, katalyzující opačnou reakci) a NADH váže na 2-oxoglutarát a vzniká L-glutamát a NAD^+ . Změnu lze vyjádřit následujícími rovnicemi [16]:



Činidla:

- R1 Enzymy (Tris pufr pH 7,8; ADP; ureasa; GLDH),
- R2 Substrát (2-oxoglutarát; NADH),
- R3 Standard (močovina o koncentraci $c = 15 \text{ mmol/l}$).

Tabulka 5.1 Přehled objemů pipetovaných roztoků, BLT urea, převzato z Příloha B

	Blank činidla	Standard	Vzorek
Pracovní roztok	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Vzorek	-	-	10 μl
Standard	-	10 μl	-
Destilovaná voda	10 μl	-	-

Postup měření:

Nejprve se připraví **pracovní roztok** smícháním 4 dílů činidla R1 s jedním dílem činidla R2. Do tří zkumavek se napipetuje po 1 ml pracovního roztoku. Zkumavky s pracovním roztokem se nechají temperovat v termobloku nastaveném na 37 °C. **Nastavení spektrofotometru:** vlnová délka 340 nm, časový režim měření absorbancí – 4 měření po 30 s, tzn. absorbance je změřena v čase 0, 30 s, 60 s a 90 s, (pro další vyhodnocování budou důležité absorbance v čase 30 s a 90 s) a vynuluje se na destilovanou vodu tlačítkem ZERO, viz Příloha B.

V okamžiku, kdy se do zkumavky s pracovním roztokem přidá 10 μl destilované vody, standardu nebo vzorku, směs se promíchá krouživým pohybem, přelije do kyvety, vloží do spektrofotometru a spustí se měření tlačítkem RUN. Vzorový výstup tištěného záznamu ze spektrofotometru viz Příloha E.

Poznámka k provedení měření (platí i pro práci s BLT creatinin liquid 500):

Z výše uvedeného postupu vyplývá, že nelze napipetovat do všech zkumavek s pracovním roztokem příslušná činidla (blank činidla, standard, vzorek) najednou, protože by se nedodržela přesná inkubační doba 1 minuta. Proto je nutné do jednotlivých zkumavek přidávat příslušná činidla postupně.

Postup při pipetování množství 10 µl (50 µl) do objemu 1 ml pracovního roztoku je takový, že příslušný objem je vypuštěn pod hladinu a špička několikrát propláchnuta.

Zpracování záznamu ze spektrofotometru, viz Příloha B:

1. Výpočet změny absorbance za minutu ΔA pro blank, standard a první vzorek:

$$\Delta A = A_1 - A_2. \quad (5.5)$$

2. Výpočet koncentrace vzorku podle vzorce:

$$c = \frac{\Delta A_{\text{vz}} - \Delta A_{\text{bl}}}{\Delta A_{\text{std}} - \Delta A_{\text{bl}}} \cdot c_{\text{std}} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] \quad (5.6)$$

kde ΔA_{vz} je rozdíl absorbancí vzorku, ΔA_{bl} rozdíl absorbancí blanku, ΔA_{std} rozdíl absorbancí standardu, c_{std} koncentrace standardu (15 mmol/l).

Tabulka 5.2 Vzorová tabulka pro zaznamenávání naměřených absorbancí a výpočet koncentrací látky urea, použité hodnoty viz Tabulka 6.2

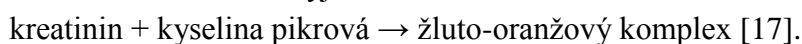
	Blank činidla	Standard	Vzorek
absorbance A1 30 s	1,342	1,222	0,999
absorbance A2 90 s	1,340	1,038	0,532
rozdíl absorbancí ΔA	0,002	0,184	0,467
Vypočítaná koncentrace c [mmol/l]		15	38,324

5.4.3 Kreatinin

Kreatinin (cyklický imid kreatinu) vzniká ve svalové tkáni jako konečný produkt kreatinu a kreatinfosfátu. Během glomerulární filtrace se koncentrace kreatininu nemění. Clearance endogenního kreatininu je nejběžnější zkouškou funkce ledvin. Horní hranicí v referenčním rozmezí je 110 µmol/l, u žen je hodnota vlivem menší svalové hmoty asi o 10 % nižší, v dětském věku je hodnota nejnižší. Chemickou strukturu kreatininu pro analýzu tvoří bílá, sypká, ve vodě rozpustná látka [17].

5.4.4 Stanovení koncentrace kreatininu v odebraném vzorku (Bio-La Test)

Stanovení kreatininu je založeno na nespecifické Jaffého reakci. Kyselina pikrová reaguje s kreatininem v alkalickém prostředí za vzniku žluto-oranžového zabarvení. Intenzita a rychlost tvorby barevného zbarvení je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku, viz Příloha C a Příloha D. Průběh lze vyjádřit následovně:



Činidla:

- R1 (hydroxid sodný),
- R2 (kyselina pikrová),
- R3 (nulový kalibrátor),
- Kreatinin urine standard (CREAT U ST, $c = 400 \mu\text{mol/l}$).

Tabulka 5.1 Přehled objemů pipetovaných roztoků, BLT kreatinin, převzato z Příloha C

	Blank činidla	Standard	Vzorek
Pracovní roztok	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Vzorek	-	-	50 μl
Standard	-	50 μl	-
Činidlo R3	50 μl	-	-

Postup měření:

Principiální postup měření s BLT kreatinin je stejný jako s BLT pro stanovování urey. Smícháním 4 dílů činidla R1 s 1 dílem činidla R2 se připraví **pracovní roztok**, který se po 1 ml napipetuje do tří zkumavek. Zkumavky se vloží temperovat do termobloku nastaveného na 37 °C. **Nastavení spektrofotometru:** vlnová délka 492 nm, časový režim měření absorbancí – 3 měření po 1 min, tzn. absorbance je změřena v čase 0, 1 min a 2 min, (pro další vyhodnocování budou důležité absorbance v čase 1 min a 2 min) a vynuluje se na destilovanou vodu tlačítkem ZERO, viz Příloha B.

V okamžiku přidání 50 μl daného činidla do zkumavky s pracovním roztokem se směs promíchá krouživým pohybem, přelije do kyvety, vloží do spektrofotometru a tlačítkem RUN se spustí měření. Vzorový výstup tištěného záznamu ze spektrofotometru viz Příloha E.

Zpracování záznamu ze spektrofotometru, viz Příloha B:

1. Výpočet změny absorbance za minutu ΔA pro blank, standard a první vzorek:
$$\Delta A = A_2 - A_1. \quad (5.7)$$
2. Bod 2 je stejný jako v případě urey, koncentrace vzorku se vypočítá podle vztahu (5.6), za koncentraci standardu c_{std} se dosadí hodnota (400 $\mu\text{mol/l}$), viz Příloha C.

Tabulka 5.2 Vzorová tabulka pro zaznamenávání naměřených absorbancí a výpočet koncentrací, použité hodnoty viz Tabulka 6.3

	Blank činidla	Standard	Vzorek
absorbance A1 1 min	0,290	0,430	1,258
absorbance A2 2 min	0,300	0,509	1,734
rozdíl absorbancí ΔA	0,010	0,079	0,476
Vypočítaná koncentrace c [$\mu\text{mol/l}$]		400	2701,449

5.5 Odvození výpočtových vztahů

Teoretickým předpokladem je, že počáteční maximální koncentrace na krevní straně exponenciálně klesá a na dialyzátové straně od nuly exponenciálně narůstá. Při zajištění nulového TMP se po určité době koncentrace na obou stranách vyrovnají. Tento proces lze popsat i matematicky. Koncentračního průběhu na dialyzátové straně se pak ze směrnice lineární části vzrůstající exponenciály vypočítá součinitel prostupu hmoty, který je ukazatelem propustnosti membrány. Při odvozování matematického popisu procesů lze vycházet z 1. Fickova zákona (jeho obecné znění je v kapitole 2.2, rovnice 2.1). **Znění 1. Fickova zákona vztaženého k procesu dialýzy** přes semipermeabilní membránu popisuje rovnice (5.8) [1]:

$$J_i = -D_i \cdot \Delta c_i \frac{A}{\Delta x} \quad (5.8)$$

kde J_i je hustota toku sledované látky i , D_i difuzivita sledované látky i , Δc_i je rozdíl koncentrací, Δx tloušťka membrány, A plocha membrány. **Hustotu toku \vec{J}_i** sledované látky i lze definovat vztahem [18]:

$$\vec{J}_i = \left(\frac{d^2 n_i}{dA dt} \right), \quad (5.9)$$

kde n_i je látkové množství látky i , a t čas. Dále je známo, že součinitel prostupu hmoty K jednotlivých látek je funkcí difuzivity D , tuto závislost vyjadřuje rovnice (5.10), kde Δx je tloušťka membrány [1]:

$$K = \frac{D}{\Delta x}, \quad (5.10)$$

Z rovnic (5.8) – (5.10) vyplývá, že 1. Fickův zákon lze zapsat ve tvaru **rovnice rychlosti prostupu hmoty**:

$$d^2 n_i = -K \cdot \nabla c_i \cdot dA \cdot dt. \quad (5.11)$$

Od vztahu (5.11) se bude odvíjet celkové matematické odvození výpočtu součinitele prostupu hmoty. **Nejdříve je vztah integrován podle dA** , integrál přes celou plochu membrány:

$$dn_i = -K \cdot \int_S \Delta c_i \cdot dA dt = -K \cdot \Delta c_i \cdot A \cdot dt, \quad (5.12)$$

$$\frac{dn_i}{dt} = -K \cdot \Delta c_i \cdot A, \quad (5.13)$$

$$\Delta c_i = c_B - c_D, \quad (5.14)$$

Δc_i je rozdíl koncentrací sledované látky, c_B koncentrace sledované látky v krevní vsádce, c_D koncentrace sledované látky v dialyzátové vsádce,

$$n_i = c_B \cdot V_B, \quad (5.15)$$

$$V_B \cdot \frac{dc_B}{dt} = -K \cdot A \cdot (c_B - c_D), \quad (5.16)$$

$$\frac{dc_B}{dt} = -\frac{K \cdot A}{V_B} \cdot (c_B - c_D), \quad (5.17)$$

$$V_D \cdot \frac{dc_D}{dt} = -K \cdot A \cdot (c_D - c_B) = K \cdot A \cdot (c_B - c_D), \quad (5.18)$$

kde V_B je objem krevní vsádky, V_D objem dialyzátové vsádky.

Pokud jsou splněny počáteční podmínky, že v čase $t = 0$ s, je $c_D = 0 \frac{mol}{l}$, lze řešit vztah (5.18) **Laplaceovu transformací**, viz Příloha F:

$$V_D s c_D(s) = K \cdot A \cdot (c_B(s) - c_D(s)) \quad (5.19)$$

$$V_D s c_D(s) + K \cdot A \cdot c_D(s) = K \cdot A \cdot c_B(s) \quad (5.20)$$

$$c_D(s) = \frac{K \cdot A \cdot c_B(s)}{V_D s + K A} \quad (5.21)$$

$$c_D(s) = \frac{K \cdot A}{V_D} \cdot \frac{c_B(s)}{s + \frac{K A}{V_D}} = \frac{K \cdot A}{V_D} \cdot c_B(s) \cdot \frac{1}{s + \frac{K A}{V_D}} \quad (5.22)$$

$$c_D(s) = \frac{K A}{V_D} \cdot c_B(t) * e^{-\frac{K A}{V_D} t}, \quad (5.23)$$

$$(5.23) \text{ jednotkově z definice konvoluce: } \left[\frac{mol}{l} \right] = \left[\frac{1}{s} \right] \left[\frac{mol}{l} \right] [s] [-]$$

vztah (5.23) je **konvolucí dvou funkcí**, z nichž první $\frac{K A}{V_D} \cdot c_B(t)$ aproximuje jednotkový skok o velikosti $\frac{K A}{V_D} \cdot c_{B0} H(t)$, kde $H(t)$ je Heavisideova funkce, a druhá funkce je odezvou na jednotkový koncentrační skok (Dirackův impuls) a má exponenciální průběh. Řešením konvoluce těchto dvou funkcí je **konvoluční integrál**, který má tvar:

$$c_D(t) = C_{B0} \int_0^t \frac{K A}{V_D} \cdot e^{-\frac{K A}{V_D} \tau} d\tau = \quad (5.24)$$

$$= C_{B0} \cdot \left[\frac{K A}{V_D} \left(-\frac{V_D}{K A} \right) \cdot e^{-\frac{K A}{V_D} t} - \frac{K A}{V_D} \left(-\frac{V_D}{K A} \right) e^{-0} \right] = C_{B0} \cdot \left[-e^{-\frac{K A}{V_D} t} + 1 \right]. \quad (5.26)$$

Rovnice (5.27) je výsledkem konvolučního integrálu a zastupuje **analytické řešení koncentračního průběhu $c_D(t)$** :

$$c_D(t) = C_{B0} \cdot \left(1 - e^{-\frac{K A}{V_D} t} \right). \quad (5.27)$$

Ze vztahu (5.27) vyplývá, že jde o exponenciální průběh. Tento exponenciální průběh koncentrace $c_D(t)$ lze vyjádřit Taylerovou řadou ve tvaru:

$$^T c_D(t) = c_D(t_0) + \frac{dc_D(t)}{dt} \Big|_{t_0} \cdot (t - t_0) + \dots \quad (5.28)$$

První člen rozvoje:

$$c_D(t_0) = 0, \quad (5.29)$$

druhý člen rozvoje – 1. derivace c_D :

$$\frac{dc_D(t)}{dt} = C_{B0} \cdot \left(1 + \frac{K A}{V_D} e^{-\frac{K A}{V_D} t} \right), \quad (5.30)$$

Taylerova řada pro první dva členy v čase $t_0 = 0$:

$$^T c_D(t) = 0 + C_{B0} \cdot \left(1 + \frac{K A}{V_D} e^{-\frac{K A}{V_D} t_0} \right) \cdot (t - t_0) = \left(C_{B0} + C_{B0} \frac{K A}{V_D} \right) t, \quad (5.31)$$

ze vztahu (5.31) vyplývá, že koncentrační průběh $c_D(t)$ je možné zapsat jako:

$$c_D(t) = \left(C_{B0} + C_{B0} \frac{K A}{V_D} \right) t. \quad (5.32)$$

Rovnice (5.32) je **rovnice přímky** lineární části exponenciálního vzrůstu koncentračního průběhu c_D a její **směrnici** je:

$$\operatorname{tg} \alpha = C_{B_0} + C_{B_0} \frac{KA}{V_D}, \quad (5.33)$$

Směrnice (5.33) obsahuje požadovaný součinitel prostupu hmoty K . Pokud bude hodnota směrnice známa, zůstává v této rovnici jediná neznámá, a to právě hledané K .

Koncentrační průběhy jsou zpracovávány pomocí software Microsoft Excel. Lineární část je vynesena do zvláštního grafu a poté je zobrazena rovnice regrese, která má **tvar obecné rovnice přímky**:

$$y = ax + b, \quad (5.34)$$

číselná hodnota na pozici a v rovnici regrese je hodnotou směrnice, tedy $\operatorname{tg} \alpha$. Zbývá tedy poslední krok odvození, **vyjádření K z rovnice (5.33)**:

$$K = \frac{(\operatorname{tg} \alpha - C_{B_0}) \cdot V_D}{A \cdot C_{B_0}} \quad (5.35)$$

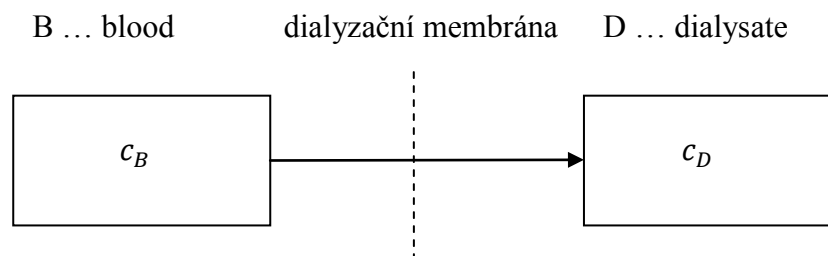
Z hlediska jednotek vyjadřuje hodnotu K jednotka $\left[\frac{cm}{s}\right]$, eventuálně $\left[\frac{m}{min}\right]$. Odvození jednotky směrnice popisuje vztah (5.36), jednotka je vztažena ke směrnici, která bude vycházet z grafu tedy $\left[\frac{mol}{l \cdot min}\right]$. Odvození jednotky součinitele prostupu hmoty viz vztah (5.37):

$$[\operatorname{tg} \alpha] = \frac{\Delta c_D}{\Delta t} = \left[\frac{\text{koncentrace}}{\text{čas}}\right] = \left[\frac{\frac{mol}{l}}{min}\right] = \left[\frac{\frac{mol}{l}}{min}\right] = \left[\frac{mol}{l \cdot min}\right], \quad (5.36)$$

$$[K] = \left[\frac{\left(\frac{mol}{l \cdot min} - \frac{mol}{l}\right) \cdot m^3}{m^2 \cdot \frac{mol}{l}}\right] = \left[\frac{m}{min}\right]. \quad (5.37)$$

5.6 Simulace průběhu koncentrací v prostředí Simulink

Vsádky experimentálního měření lze modelovat pomocí dvou kompartmentů, které odděluje dialyzační membrána. V čase $t = 0 \text{ s}$ je v krevní vsádce homogenně rozptýlena látka o koncentraci c_B . V dialyzátové vsádce je v čase $t = 0 \text{ s}$ koncentrace c_D rovna nule. Po spuštění aparatury dochází k difuzi této sledované látky do dialyzátového kompartmentu. Pro zajištění toho, aby látky pronikaly pouze difúzí, je nutné, aby $TMP = 0$. V obou kompartmentech je stejný objem rozpouštědla a stejná teplota 37°C . Schematické znázornění tohoto kompartmentového modelu viz Obrázek 5.1 [19].



Obrázek 5.1 Kompartmentový model experimentálního měření

5.6.2 Odvození výpočtových vztahů užitých v simulaci

Jednosměrná difúze látek z krevní do dialyzátové vsádky se zastaví v určitém stacionárním stavu, tj. stavu, kdy se koncentrace na obou stranách vyrovnají. Současně tedy

probíhají dvě protisměrné reakce. Tyto reakce se nazývají reakcemi zvrtnými. Obecně je lze popsat rovnicemi (5.38) – (5.47) [19], kde k_1 zastupuje rychlostní konstantu přestupu látky z kompartmentu B do kompartmentu D a k_{-1} rychlostní konstantu současně probíhajícího koncentračního nárůstu v kompartmentu B:



Rovnice popisující obecný průběh koncentrací mají tvar a je okamžitá koncentrace látky v kompartmentu A, b je okamžitá koncentrace sledované látky v kompartmentu B:

$$\frac{dc_B}{dt} = -k_1 c_B + k_{-1} c_D; \quad (5.39)$$

$$\frac{dc_D}{dt} = k_1 c_B - k_{-1} c_D = -\frac{dc_B}{dt}. \quad (5.40)$$

Stacionární stav nastane v případě, že $\frac{dc_B}{dt} = 0$ a $\frac{dc_D}{dt} = 0$. Látkovou bilanci lze vyjádřit jednoduchou rovnicí (5.45), kde \bar{c}_B a \bar{c}_D jsou rovnovážné koncentrace a R vyjadřuje rovnovážnou konstantu:

$$-k_1 \bar{c}_B + k_{-1} \bar{c}_D = k_1 \bar{c}_D - k_{-1} \bar{c}_B, \quad (5.41)$$

$$-k_1 \bar{c}_B - k_{-1} \bar{c}_B = -k_{-1} \bar{c}_D - k_{-1} \bar{c}_D, \quad (5.42)$$

$$-2k_1 \bar{c}_B = -2k_{-1} \bar{c}_D, \quad (5.43)$$

$$\frac{\bar{c}_D}{\bar{c}_B} = \frac{k_1}{k_{-1}} = R. \quad (5.45)$$

Pro řešení diferenciálních rovnic ze vztahů (5.39 – 5.40) lze použít opět Laplaceovu transformaci, při splnění počátečními podmínkami $c_{D0} = 0$ je možné průběh koncentrace $c_B(t)$ zapsat vztahem:

$$c_B(t) = \frac{c_{B0}}{k_1 + k_{-1}} [k_{-1} + k_1 e^{-(k_1 + k_{-1})t}], \quad (5.46)$$

a protože je membrána považována z obou stran stejně propustnou, tzn. $k_1 = k_{-1} = k$, **průběh koncentrace $c_B(t)$** lze zjednodušit na zápis:

$$c_B(t) = \frac{c_{B0}}{2k} [k + k e^{-(k+k)t}] = \frac{c_{B0}}{2} + \frac{c_{B0}}{2} e^{-(2k)t}, \quad (5.46)$$

a analytické řešení pro **průběh koncentrace $c_D(t)$** s počáteční podmínkou $c_{D0} = 0$:

$$c_D(t) = c_{B0} - c_B(t) = c_{B0} - \left(\frac{c_{B0}}{2} + \frac{c_{B0}}{2} e^{-(2k)t} \right). \quad (5.47)$$

Obecný popis lze propojit s matematickým odvozením diferenciální rovnice ze vztahu (5.17) odvozené v kapitole 5.5, a to:

$$\frac{dc_B}{dt} = -k \cdot (c_B - c_D) = -\frac{K \cdot A}{V_B} \cdot (c_B - c_D), \quad (5.48)$$

a diferenciální rovnice ze vztahu (5.18):

$$\frac{dc_D}{dt} = k \cdot (c_B - c_D) = \frac{K \cdot A}{V_D} \cdot (c_B - c_D). \quad (5.49)$$

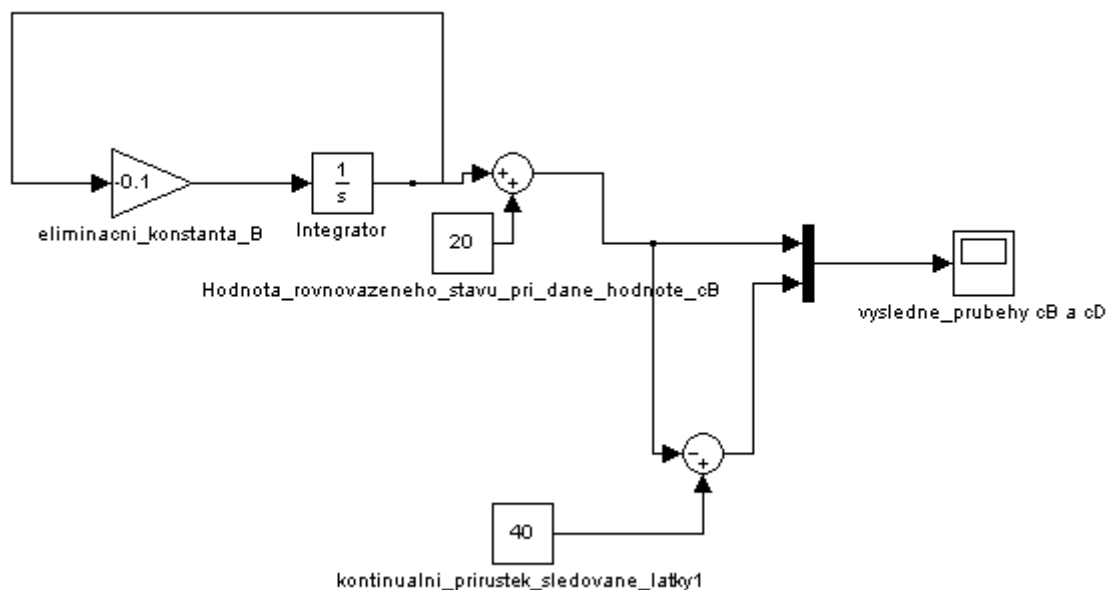
Výsledná analogie mezi obecným popisem kompartmentového modelu rovnice (5.38 – 5.47) a popisem matematického odvození koncentračních průběhů rovnice (5.11 – 5.18) je

zřetelná. V rovnicích (5.39 – 5.40) zastupuje hodnotu zlomku $\frac{K \cdot A}{V_B}$ rychlostní konstanta k . Dosazení zlomku do rovnic popisují rovnice (5.48 – 5.49) a jak je zmíněno, shodují se s odvozenými rovnicemi v kapitole 5.5.

Shrnutí výsledných vztahů:

$$c_B(t) = \frac{c_{B0}}{2} + \frac{c_{B0}}{2} e^{-(2k)t}, \quad (5.46)$$

$$c_D(t) = c_{B0} - c_B(t) = c_{B0} - \left(\frac{c_{B0}}{2} + \frac{c_{B0}}{2} e^{-(2k)t} \right) \quad (5.47)$$

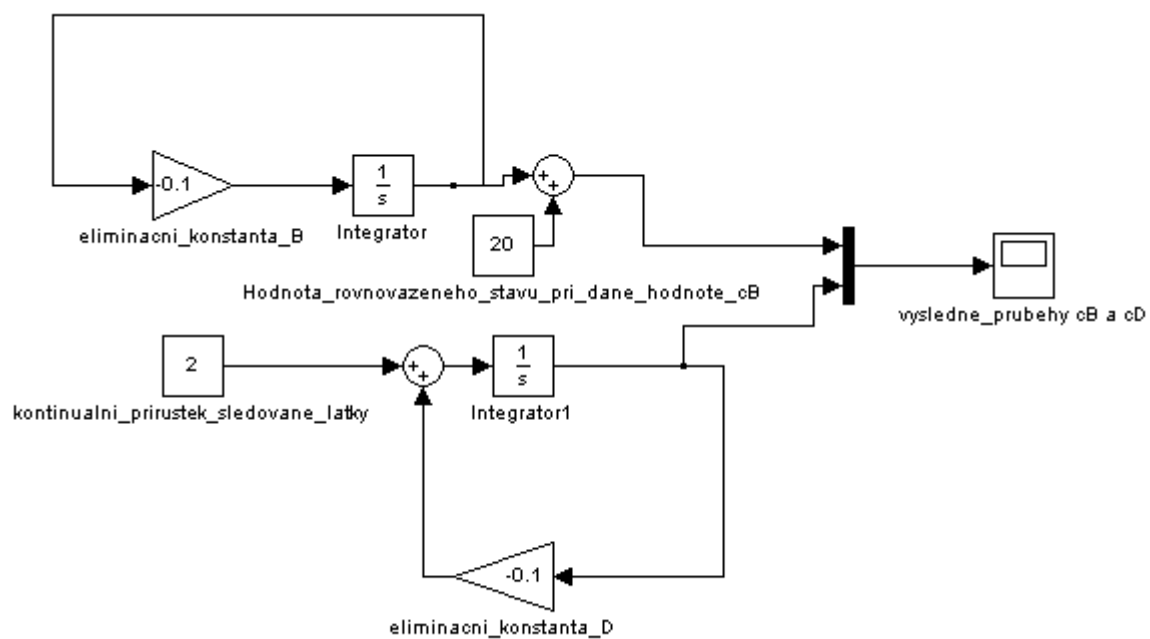


Obrázek 5.2 Simulace koncentračních průběhů podle rovnic (5.46) a (5.47)

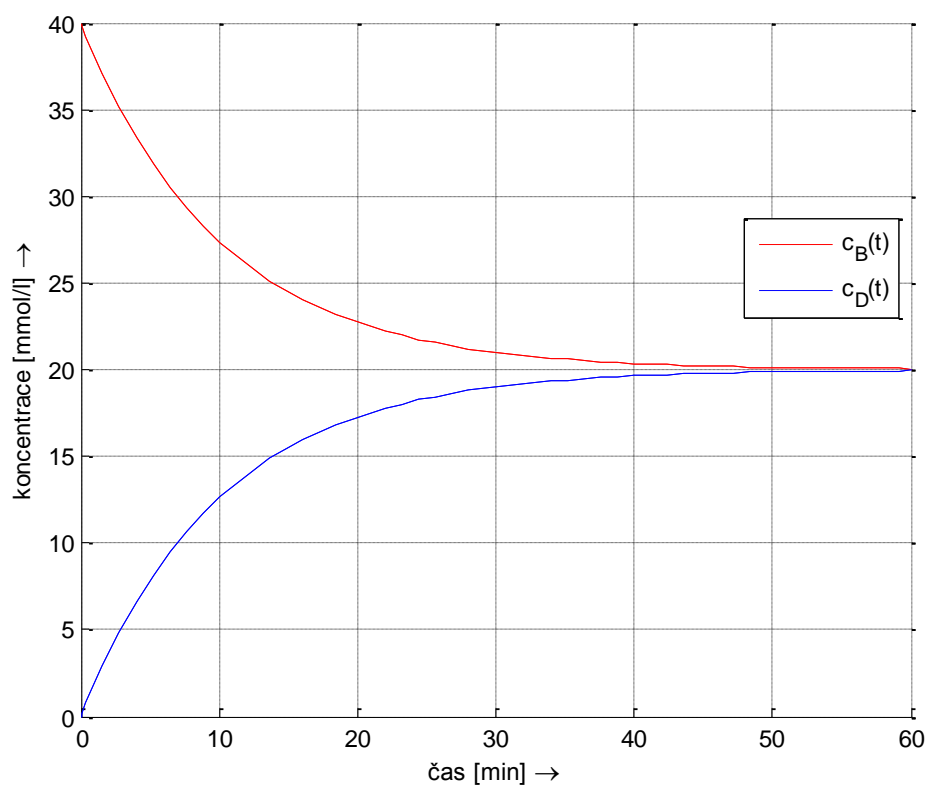
Obrázek 5.2: Blok s integrátorem popisuje rovnici (5.46): integrátor je nastaven na počáteční hodnotu 20, eliminační konstanta na krevní straně B je rovna hodnotě $-0,1$, na výstupu je koncentrace c_B navýšena o hodnotu $\frac{c_{B0}}{2}$, tj. 20 mmol/l . Druhá část popisuje rovnici (5.47), od c_{B0} odečítá $c_B(t)$, oba výsledné průběhy $c_B(t)$ a $c_D(t)$ jdou do bloku MUX a následně do zobrazovače SCOPE.

Simulaci je možné realizovat také čistě pro diferenciální rovnice (5.17 – 5.18). Jsou-li brány tyto rovnice jako zvrtné, musí se do schématu nastavit jednotlivé parametry tak, aby se průběhy c_B a c_D protnuly v ustáleném koncentračním stavu. **Obrázek 5.3:** ve vrchním bloku zastupujícím diferenciální rovnici (5.17), kde je výstupem c_B je integrátor nastaven na počáteční hodnotu 20. Ve spodním bloku, zastupujícím diferenciální rovnici (5.18), je integrátor s počáteční podmínkou 0, výslednou zobrazovanou hodnotou je koncentrační průběh c_D .

Hodnota eliminační konstanty pro simulace byla zvolena pouze náhodně. Ustálený stav nastane přibližně v 60té minutě. Skutečný koncentrační průběh a tím i eliminační konstantu však ukážou až samotné výsledky experimentálního měření.



Obrázek 5.3 Simulace koncentračních průběhů podle rovnic (5.17) a (5.18)



Obrázek 5.4 Výstup simulací - průběhy koncentrací $c_B(t)$ a $c_D(t)$

5.7 Doplnující možnost odvození výpočtových vztahů

Pro úplnost je vhodné zmínit, že pokud by byly odebírány koncentrace z obou vsádek ve stejných, ne příliš velkých časových intervalech, po dostatečnou dobu. Dal by se součinitel prostupu hmoty stanovit i následujícím způsobem, postup byl čerpán ze zdroje [19]:

Jako výchozí se použije rovnice (5.47):

$$c_D(t) = c_{B0} - c_B(t) = c_{B0} - \left(\frac{c_{B0}}{2} + \frac{c_{B0}}{2} e^{-(2k)t} \right),$$

kterou je třeba upravit do tvaru (5.51) a následuje zlogaritmování tohoto vztahu:

$$c_D = c_{B0} - \frac{c_{B0}}{2} - \frac{c_{B0}}{2} e^{-(2k)t}, \quad (5.50)$$

$$c_D = \frac{c_{B0}}{2} (1 - e^{-(2k)t}). \quad (5.51)$$

Hodnota $\frac{c_{B0}}{2}$ vyjadřuje rovnovážnou koncentraci, ke které systém směřuje, ve vztahu (5.51) bude nahrazena dále hodnotou $c_D(\infty)$. Platí že $c_D(\infty) = c_B(\infty)$.

$$c_D = c_D(\infty) (1 - e^{-(2k)t}), \quad (5.52)$$

$$\ln \left(\frac{c_D(\infty)}{c_D(\infty) - c_D} \right) = 2kt. \quad (5.53)$$

Zjišťováním koncentrací jednotlivých odebraných vzorků a vynášením těchto hodnot podle vztahu $\ln \left(\frac{c_D(\infty)}{c_D(\infty) - c_D} \right)$ do grafu, v závislosti na čase oděru, se získá bodový průběh. V ideálním případě by tento průběh měl být lineární. Směrnice přímky proložené tímto průběhem by pak měla velikost rovnající se hodnotě $2k$.

Ověření, že tomu tak je i na krevní straně lze odvodit z dosazení do rovnice (5.49):

$$\frac{dc_D}{dt} = k \cdot (c_B - c_D),$$

Okamžitou rychlost změny poměru koncentrací $\frac{c_D}{c_B}$ vyjadřuje rovnice:

$$\frac{d}{dt} \frac{c_D}{c_B} = k \cdot \left(1 - \frac{c_D}{c_B} \right), \quad (5.54)$$

dále se vztah už pouze integruje, viz (5.56) a zlogaritmuje, viz (5.57):

$$\frac{c_D}{c_B} = 1 - e^{kt}, \quad (5.55)$$

$$\ln \left(\frac{c_B}{c_B - c_D} \right) = kt. \quad (5.56)$$

V rovnicích (5.50 – 5.56) opět zastupuje hodnotu zlomku $\frac{K \cdot A}{V_B}$ konstanta k . V průběhu měření tedy lze odebírat vzorky ve stejných časových intervalech z obou vsádek, vyhodnocovat jejich koncentrace a podle vztahu $\ln \left(\frac{c_B}{c_B - c_D} \right)$ vynášet do grafu v závislosti na čase odběru. Směrnice přímky, která je určena lineárním průběhem, má hodnotu k . Z hlediska realizace je toto měření náročnější na spotřebu jednotlivých BIO-LA-testů.

Součinitel prostupu hmoty se pak vypočítá jako:

$$K = \frac{kV_B}{A}. \quad (5.57)$$

6 Měření a vyhodnocení naměřených hodnot

6.1 Obecný postup měření

Před samotným měřením je nutné: připravit vsádky podle popisu v kapitole 5.2, vybrat časové schéma odběru vzorků a stanovit rychlost **průtoku měřicí celou**, v průběhu celého měření musí být tato hodnota konstantní.

Na základě celkového počtu odběrů je nutné napipetovat do zkumavek pracovní roztok příslušného Bio-La Testu. Zkumavky je nutné uzavřít víčkem a ve stabilním stojanu vložit do ledničky (teplota skladování namíchaného pracovního roztoku i jednotlivých komponent BLT je 8 °C, platí pro oba použité BLT). (Do počtu pipetovaných zkumavek je nutné zahrnout i pracovní roztoky, které se užijí pro stanovení koncentrace blanku a standardu, daného BLT). **Množství pracovního roztoku** Bio-La Testů se míchá vždy jednorázově dle návodu a potřeby na dané měření, je proto vhodné mít i určitou rezervu, (např. na 3 ks zkumavek navíc). Před samotnou analýzou se zkumavky s pracovním roztokem vkládají do termobloku, vždy asi s 15 minutovým předstihem, aby měly požadovanou teplotu 37 °C.

6.1.1 Rychlost proudění měřicí celou

Rychlost proudění kapaliny měřicí celou je důležitým parametrem, který je třeba znát. V závislosti na rychlosti proudění v , průtočném průřezu d a kinematické viskozitě kapaliny ν se určuje hodnota Reynoldsova čísla Re (viz (6.1)), podle které je posuzován typ proudění buď laminární, nebo turbulentní. Přejít mezi těmito dvěma typy proudění lze definovat podle hodnoty Reynoldsova kritického čísla Re_{kr} . Vztah pro laminární proudění lze popsat nerovností (6.1) a turbulentní proudění nerovností (6.2).

$$Re < Re_{kr}, \quad (6.1)$$

$$Re > Re_{kr}, \quad (6.2)$$

pro kruhové potrubí je $Re_{kr} = 2320$.

Hranice mezi laminárním a turbulentním prouděním není přesně definována a tvoří ji přechodová oblast, kde proudění kapaliny není ani laminární ani turbulentní. Z experimentálních výzkumů bylo zjištěno, že tato oblast se může nacházet v rozmezí Reynoldsova čísla 1000 až 10000.

Výpočet Reynoldsova čísla:

$$Re = \frac{vd}{\nu}. \quad (6.3)$$

Kinematická viskozita ν je v technické praxi často užívanou hodnotou. Hodnota viskozity závisí na teplotě – s rostoucí teplotou klesá. Hodnotu kinematické viskozity lze vypočítat:

$$\nu = \frac{1,775 \cdot 10^{-6}}{1 + 0,0337t + 0,000221t^2}, \quad (6.4)$$

kde t je teplota ve $^{\circ}\text{C}$.

Průtočný průřez je pro trubku kruhového průřezu roven průměru trubky d . Pro potrubí nekruhového průřezu se definuje hydraulický průměr d_h [20]:

$$d_h = \frac{4S}{o}, \quad (6.5)$$

kde S je obsah průřezu potrubí v $[\text{m}^2]$, o smočený obvod $[\text{m}]$.

Rychlost proudění udává vztah (6.6), kde Q $[\text{m}^3/\text{s}]$ [20]:

$$v = \frac{Q}{S}, \quad (6.6)$$

Vztaženo k podmínkám v experimentální aparatuře:

Měřicí cela má obdélníkový průřez o rozměrech $a = 51,10 \text{ mm}$, $b = 1,65 \text{ mm}$. Pro hodnotu d_h při obdélníkovém průřezu platí:

$$d_h = \frac{4ab}{2(a+b)} = \frac{2ab}{a+b}, \quad (6.7)$$

$$d_h = \frac{4 \cdot 51,1 \cdot 1,65}{2(51,1 + 1,65)} = 3,196777 \text{ mm} = 3,196777 \cdot 10^{-3} \text{ m}, \quad (6.8)$$

kinematická viskozita vodných roztoků o teplotě 37°C :

$$\nu = \frac{1,775 \cdot 10^{-6}}{1 + 0,0337 \cdot 37 + 0,000221 \cdot 37^2} = 6,9622887 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}, \quad (6.9)$$

při průtoku $300 \text{ ml/min} = 5 \text{ ml/s} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ l/s} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$ je rychlost proudění:

$$v = \frac{5 \cdot 10^{-6}}{(51,1 \cdot 1,65) \cdot 10^{-6}} = 0,0593 \text{ m/s}, \quad (6.10)$$

hodnota Reynoldsova čísla:

$$Re = \frac{0,0593 \cdot 3,196777 \cdot 10^{-3}}{6,9622887 \cdot 10^{-7}} = 272,28. \quad (6.11)$$

Z výpočtů vyplývá, že proudění se nachází v laminární oblasti. Pokud mělo být dosaženo turbulentního proudění, při kterém je vykazováno lepší odstraňování sledovaných látek vlivem vířivého promíchávání látky, muselo by být Reynoldsovo číslo alespoň 4000 nebo i více, aby se vyloučila přechodová oblast. Průtok měřicí celou pro hodnotu $Re = 4000$ je $2,785 \text{ l/s}$. S danými průtokoměry o max. průtoku 400 ml/min takové měření realizovat nelze.

6.2 Realizace měření

Jde o experimentální měření a není tedy známo, v jakém časovém intervalu se nachází hledaná lineární část exponenciálního koncentračního vzestupu na dialyzátové straně. Pro první měření je tedy dobré zvolit delší časové schéma odběrů vzorků s většími rozestupy mezi jednotlivými odběry vzorků.

Do stabilního stojanu o dostačující kapacitě míst jsou rozmístěny prázdné zkumavky. Do těchto zkumavek se budou po řadě odkládat špičky s příslušným objemem odebraného vzorku. Pro analýzu urey se odebírá $10 \mu\text{l}$, pro analýzu kreatininu $50 \mu\text{l}$. (Z praktického hlediska je vhodné, aby zkumavky na vzorky z krevní vsádky byly jedné barvy a zkumavky na vzorky z dialyzátové strany barvy druhé).

V průběhu měření musí být dodrženy následující základní parametry:

- konstantní průtok na obou stranách, a to 300 ml/min,
- konstantní teplota v obou vsádkách 37 °C,
- odběr vzorku v přesně daný čas,
- sledování difference teploty mezi vsádkou a dialyzátovým vstupem do měřicí cely,
- těsnost všech spojů mezi jednotlivými komponenty,
- těsnost spoje desek měřicí cely.

Po ukončení každého měření se aparatura zastaví a přichází na řadu **spektrofotometrická analýza vzorků**. Vzorky se analyzují ve vzestupném pořadí, tzn. od vzorku odebraného v čase 0 s. Postup při analýze vzorku je následovný a navazuje na principy popsané v kapitole 5.4 s tím rozdílem, že tentokrát musí být vyhřátý pracovní roztok přelit do zkumavky se špičkou s odebraným vzorkem. Špička se několikrát propláchně napuštěním a vypuštěním pomocí pipety. Zajistí se tak, že do pracovního roztoku se dostane příslušný objem odebraného vzorku. Takto promíchaná směs se okamžitě přelije do kyvety, vloží do spektrofotometru a zmáčkne se tlačítko RUN pro spuštění analýzy. Absorbance pracovního roztoku se vzorkem se v čase mění, musí být tento postup proveden co nejrychleji. Spektrofotometrickou analýzou se získají absorbance jednotlivých vzorků. Hodnoty se z tištěného záznamu následně přepisují do tabulky v prostředí Microsoft Excel, kde budou dále zpracovávány. Koncentrace se vypočítá dle vzorců uvedených v kapitole 5.4.

Po výpočtu koncentrací vzorků se sestojí graf závislosti koncentrace dané látky na čase odběru. Do jednoho grafu se vynáší průběh koncentrace jedné sledované látky na krevní i dialyzátové straně, tedy c_B i c_D .

6.2.1 Měření č. 1

Vodný roztok krve obsahoval obě sledované látky – kreatinin i ureu. Časové schéma odběru vzorků: odběr každých 10 minut, z krevní i dialyzátové vsádky, po dobu 70 minut, viz 6.4. Z krevní i dialyzátové vsádky se současně odebíraly dva vzorky 10 μ l pro stanovení koncentrace urey a 50 μ l pro stanovení koncentrace kreatininu.

Potřebný počet zkumavek s pracovním roztokem na analýzu: 18 ks z Bio-La Testu urea a 18 ks z Bio-La Testu kreatinin.

Diference teploty mezi krevní vsádkou a vstupem do měřicí cely se pohybovala v rozmezí 0,27 - 0,30 °C, s nejčastější hodnotou 0,28 °C.

Koncentrační průběh látky urea znázorňuje Graf 6.1, koncentrační průběh látky kreatinin Graf 6.2. Získané grafy mají na dialyzátové straně očekávaný exponenciální nárůst, na straně krevní očekávaný exponenciální pokles koncentrace. Po zhruba 30 minutách dochází k vyrovnání koncentrací. Z grafů vyplývá, že hledaná oblast lineárního vzestupu se nachází v rozmezí 0 min – 20 min. Další měření jsou na základě tohoto zjištění zaměřena právě na tuto oblast.

6.2.2 Měření č. 2

Časové schéma odběru vzorků viz Tabulka 6.2. Odběr vzorků z dialyzátové vsádky byl s větší frekvencí hlavně v oblasti prvních deseti minut. Z krevní vsádky postačuje odběr každých 5 minut. Vzhledem k vysoké frekvenci odběru vzorků z dialyzátové strany, obsahoval vodný roztok krve pouze látku urea. Diference teplot mezi krevní vsádkou a vstupem do měřicí cely se pohybovala v rozmezí 0,45 - 0,48 °C. Diference je vyšší, jelikož v průběhu celého měření byla krevní vsádka otevřena. Diference je vyšší než u měření č. 1, jelikož v průběhu celého měření byla krevní vsádka i dialyzátová vsádka otevřena. Výsledné koncentrační průběhy viz Graf 6.3. Za lineární se uvažovala oblast v rozmezí (0:00 – 4:40) viz Graf 6.4.

6.2.3 Měření č. 3

Časové schéma odběru vzorků je stejné jako u měření č. 2, pouze je délka měření o 5 minut delší (viz tabulka Tabulka 6.3). Vodný roztok krve obsahoval pouze látku kreatinin. Diference teplot mezi krevní vsádkou a vstupem do měřicí cely se pohybovala opět v rozmezí 0,45 - 0,48 °C. Výsledné koncentrační průběhy viz Graf 6.5. Za lineární se uvažovala oblast v rozmezí (0:00 – 4:40).

V grafech lineárního vzestupu se graf proloží přímkou a zobrazí se rovnice regrese této přímky. Hodnota směrnice přímky bude použita k výpočtu součinitele prostupu hmoty.

Při všech měřeních je dobré při každé nové přípravě krevní vsádky namíchat stejnou počáteční koncentraci dané sledované látky. Při dodržení tohoto pravidla se může na závěr udělat grafické zhodnocení jednotlivých měření pro danou látku a to tak, že koncentrační průběhy se zobrazí do jednoho grafu. Graf 6.7 je souhrnným grafem pro koncentrační průběh látky urea při 1. a 2. měření. Graf 6.8 je souhrnným grafem pro koncentrační průběh látky kreatinin z 1. a 3. měření. Je patrné, že průběhy se prolínají, tudíž podmínky při obou měřeních byly stejné.

6.3 Výpočet součinitele prostupu hmoty

Pro výpočet součinitele prostupu hmoty se použije vztah (5.35), z kapitoly 5.5:

$$K = \frac{(\operatorname{tg} \alpha - C_{B_0}) \cdot V_D}{A \cdot C_{B_0}}.$$

Rozměry dialyzační membrány jsou:

- $a = 0,051 \text{ m}$,
- $b = 0,0854 \text{ m}$,
- účinná plocha má tedy velikost $A = a \cdot b$, tj. $A = 0,00436394 \text{ m}^2$,
- $V_D = 5 \text{ l} = 0,005 \text{ m}^3$.

Výpočet součinitele prostupu pro látku urea, kde $\operatorname{tg} \alpha = 1,9215$
a $C_{B_0} = 38,324 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$:

$$K_{\text{urea}} = \frac{(1,9215 - 38,324) \cdot 5 \cdot 10^{-3}}{0,00436394 \cdot 38,324} = \underline{\underline{-1,088307476 \frac{\text{m}}{\text{min}}}}. \quad (6.12)$$

Výpočet součinitele prostupu pro látku kreatinin, kde $\text{tg } \alpha = 140,56$
a $C_{B_0} = 2701,000 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$:

$$K_{\text{kreatinin}} = \frac{(140,56 - 2701,000) \cdot 5 \cdot 10^{-3}}{0,00436394 \cdot 271,000} = \underline{\underline{-1,0861286 \frac{\text{m}}{\text{min}}}}. \quad (6.13)$$

Záporné znaménko výsledku součinitele prostupu hmoty pro sledovanou látku značí pouze směr, kterým se látka pohybuje. V tomto případě z krevní strany do dialyzátové.

K posouzení účinnosti dialyzátoru se používá clearance dialyzátoru pro jednotlivé látky. V případě prostupu látek přes dialyzační membránu pouze difúzí, lze hodnotu clearance zjistit pomocí následujícího součinu [1]:

$$K \cdot A \left[\frac{\text{m}^3}{\text{min}} \right], \quad (6.14)$$

je zvykem tuto hodnotu udávat v jednotce $\left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right]$, převod vztahu (6.14) na vyjádření pomocí této jednotky:

$$K \cdot A \cdot 10^6 \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right], \quad (6.15)$$

Clearance experimentální aparatury pro látku urea:

$$K_{\text{urea}} \cdot A \cdot 10^6 = 1,088307476 \cdot 0,00436394 \cdot 10^6 = 4749 \frac{\text{ml}}{\text{min}}. \quad (6.16)$$

Clearance experimentální aparatury pro látku kreatinin:

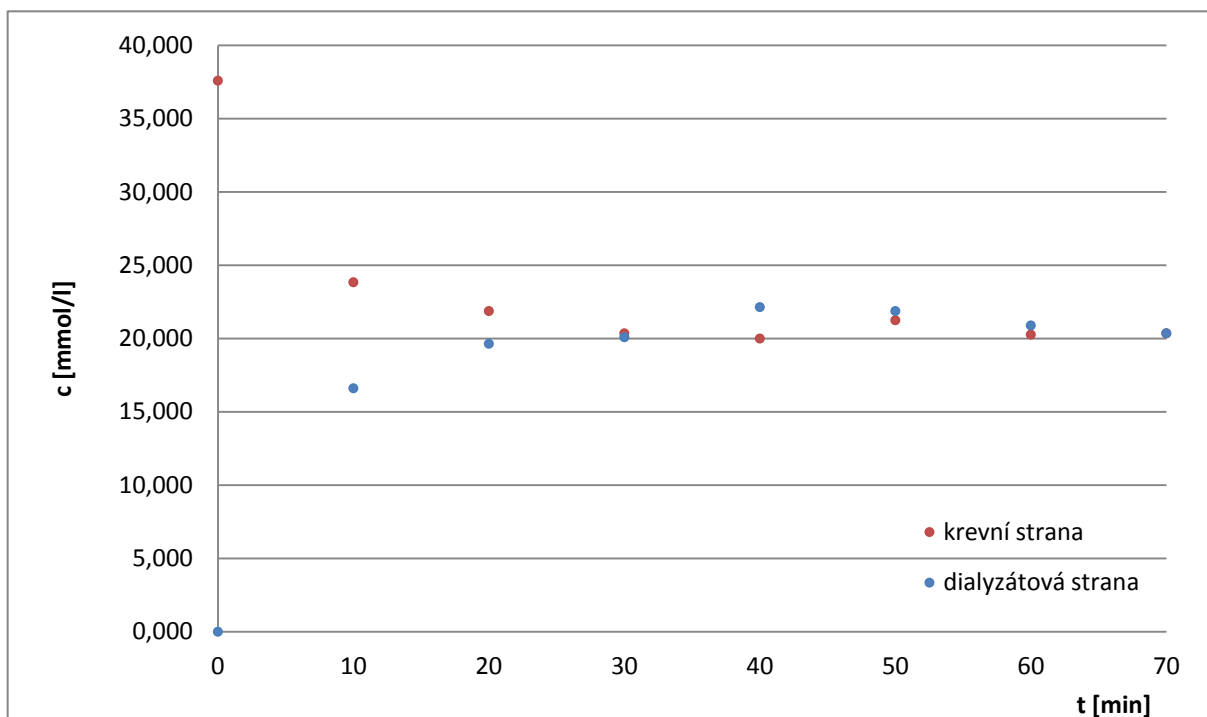
$$K_{\text{kreatinin}} \cdot A \cdot 10^6 = 1,0861286 \cdot 0,00436394 \cdot 10^6 = 4740 \frac{\text{ml}}{\text{min}}. \quad (6.17)$$

Získané výsledky jsou diskutovány v kapitole 7.

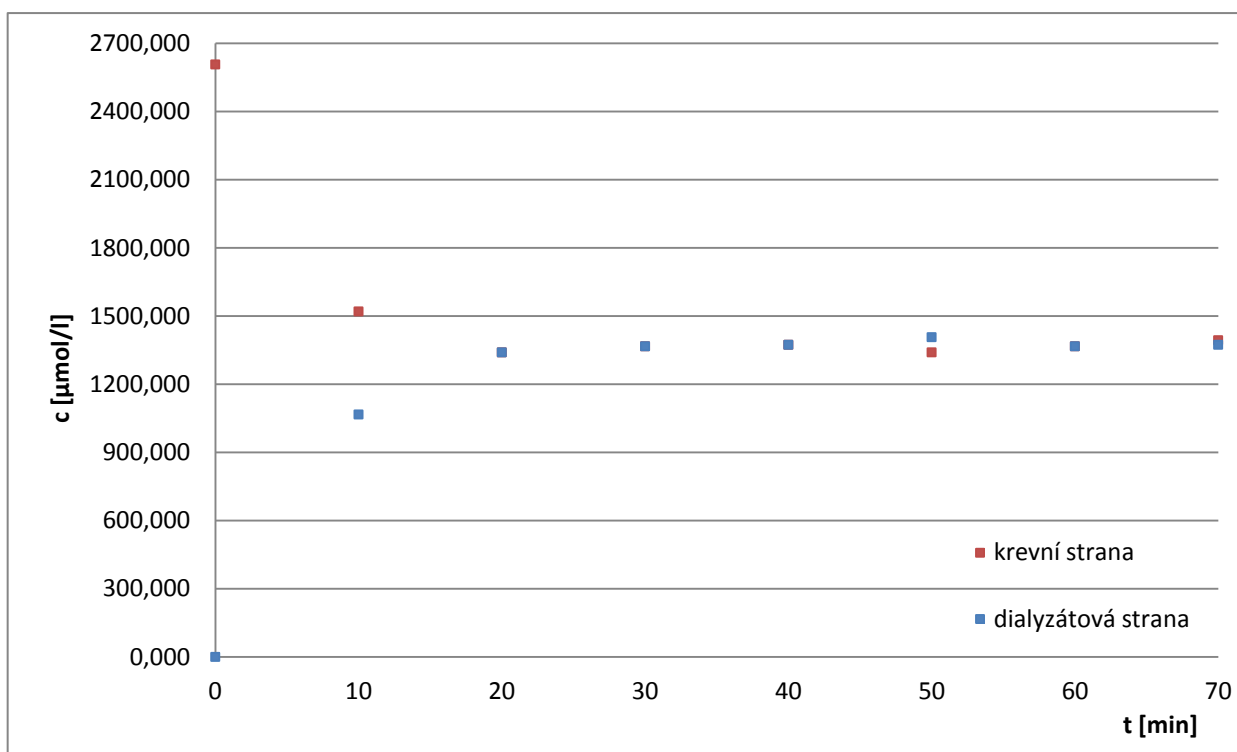
6.4 Dokumentace naměřených hodnot a grafických výstupů

Tabulka 6.1 Měření č. 1: naměřené hodnoty průběhu koncentrací v časovém schématu 0 min – 70 min

UREA										
Čas odběru vzorku [min]:			0	10	20	30	40	50	60	70
	Blank	Standard	Krevní strana							
A 30 s	1,396	1,272	1,042	1,224	1,218	1,238	1,212	1,220	1,226	1,232
A 90 s	1,394	1,102	0,619	0,955	0,971	1,008	0,986	0,980	0,997	1,002
rozdíl Δ A	0,002	0,170	0,423	0,269	0,247	0,230	0,226	0,240	0,229	0,230
c [mmol/l]		15,000	37,589	23,839	21,875	20,357	20,000	21,250	20,268	20,357
			Dialyzátová strana							
A 30 s			0,000	1,250	1,216	1,218	1,200	1,214	1,212	1,232
A 90 s			0,000	1,062	0,994	0,991	0,950	0,967	0,976	1,002
rozdíl Δ A			0,000	0,188	0,222	0,227	0,250	0,247	0,236	0,230
c [mmol/l]			0,000	16,607	19,643	20,089	22,143	21,875	20,893	20,357
KREATININ										
Čas odběru vzorku [min]:			0	10	20	30	40	50	60	70
	Blank	Standard	Krevní strana							
A 1 min	0,263	0,411	1,306	0,825	0,772	0,748	0,738	0,744	0,758	0,758
A 2 min	0,266	0,474	1,700	1,056	0,976	0,956	0,947	0,948	0,966	0,970
rozdíl Δ A	0,003	0,063	0,394	0,231	0,204	0,208	0,209	0,204	0,208	0,212
c [μmol/l]		400,000	2606,667	1520,000	1340,000	1366,667	1373,333	1340,000	1366,667	1393,333
			Dialyzátová strana							
A 1 min			0,000	0,712	0,723	0,748	0,738	0,744	0,749	0,749
A 2 min			0,000	0,875	0,927	0,956	0,947	0,958	0,957	0,958
rozdíl Δ A			0,000	0,163	0,204	0,208	0,209	0,214	0,208	0,209
c [μmol/l]			0,000	1066,667	1340,000	1366,667	1373,333	1406,667	1366,667	1373,333



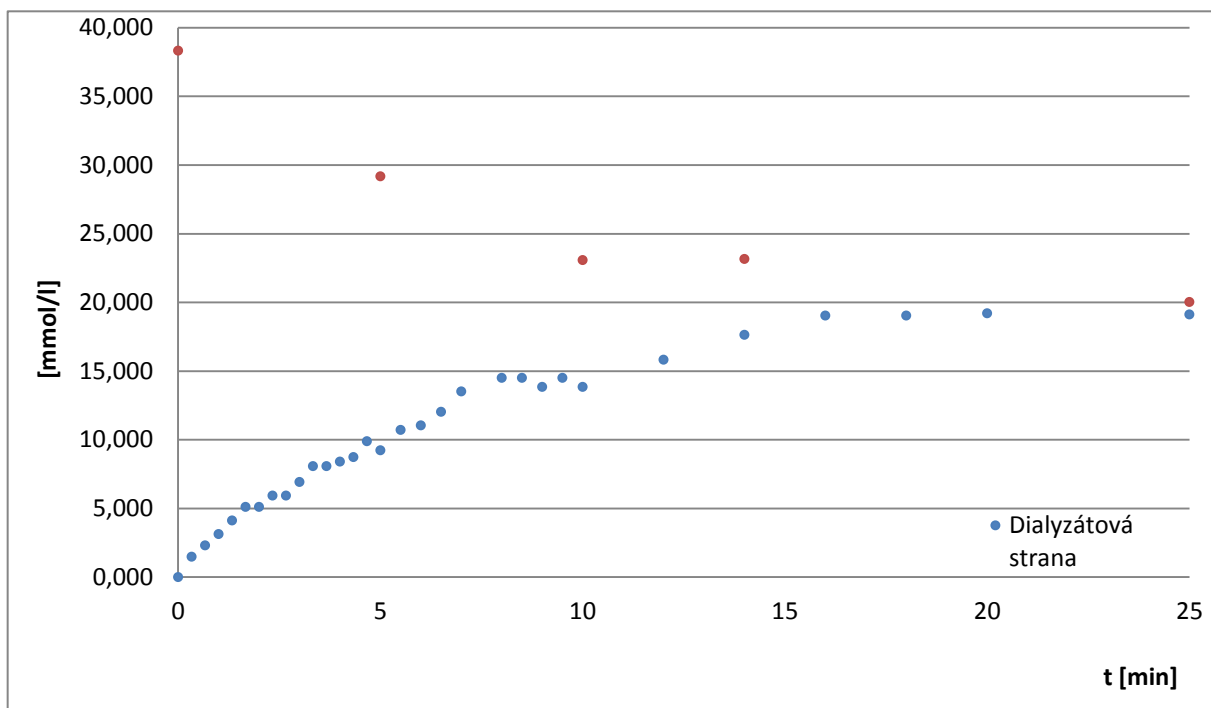
Graf 6.1 Průběh koncentrace látky urea v časovém schématu 0 min – 70 min



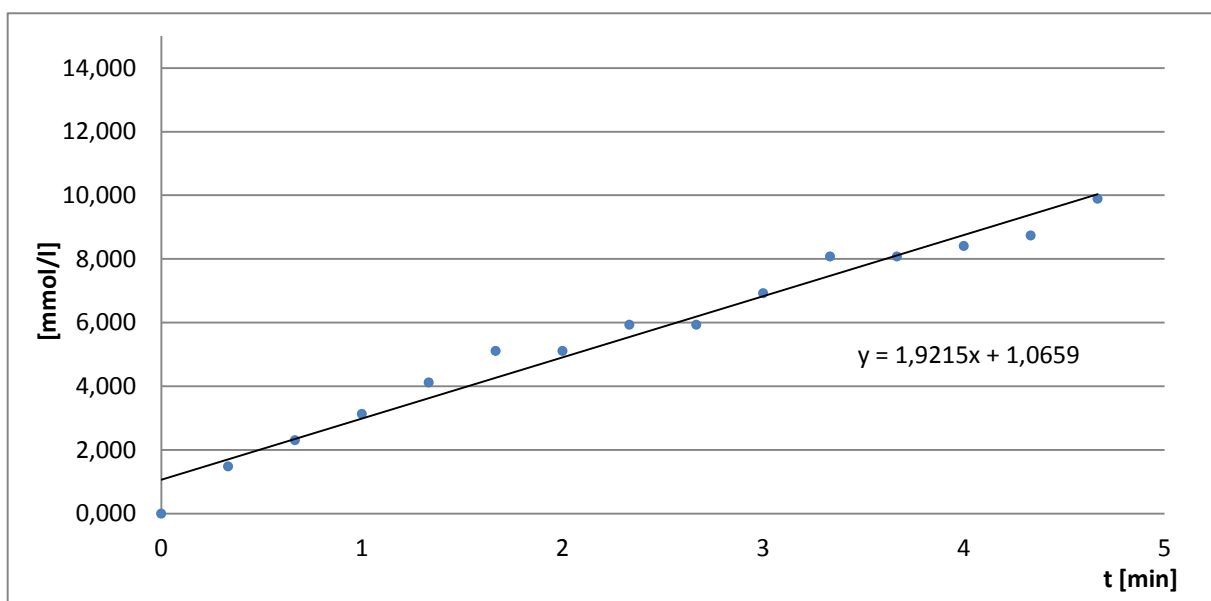
Graf 6.2 Průběh koncentrace látky kreatinin v časovém schématu 0 min – 70 min

Tabulka 6.2 Měření č. 2: naměřené hodnoty koncentračního průběhu urey v časovém schématu 0 min – 25 min

		A 30 s	A 90 s	rozdíl ΔA	c [mmol/l]						
	Blank	1,342	1,340	0,002	15						
	Standard	1,222	1,038	0,184							
Pořadí odběru:	čas odběru vzorku [min:s]	A 30 s	A 90 s	rozdíl ΔA	c [mmol/l]	Pořadí odběru:	čas odběru vzorku [min:s]	A 30 s	A 90 s	rozdíl ΔA	c [mmol/l]
		<i>Dialyzátová strana</i>				21	7:30	1,202	1,022	0,180	14,670
1	0:00	1,338	1,342	-0,004	0,000	22	8:00	1,202	1,024	0,178	14,505
2	0:20	1,320	1,300	0,020	1,484	23	8:30	1,218	1,040	0,178	14,505
3	0:40	1,320	1,290	0,030	2,308	24	9:00	1,216	1,046	0,170	13,846
4	1:00	1,320	1,280	0,040	3,132	25	9:30	1,210	1,032	0,178	14,505
5	1:20	1,286	1,234	0,052	4,121	26	10:00	1,212	1,042	0,170	13,846
6	1:40	1,292	1,228	0,064	5,110	27	12:00	1,198	1,004	0,194	15,824
7	2:00	1,296	1,232	0,064	5,110	28	14:00	1,180	0,964	0,216	17,637
8	2:20	1,276	1,202	0,074	5,934	29	16:00	1,160	0,927	0,233	19,038
9	2:40	1,258	1,184	0,074	5,934	30	18:00	1,180	0,947	0,233	19,038
10	3:00	1,256	1,170	0,086	6,923	31	20:00	1,152	0,917	0,235	19,203
11	3:20	1,260	1,160	0,100	8,077	32	25:00	1,136	0,902	0,234	19,121
12	3:40	1,260	1,160	0,100	8,077						
13	4:00	1,252	1,148	0,104	8,407						
14	4:20	1,250	1,142	0,108	8,736						
15	4:40	1,212	1,090	0,122	9,890						
16	5:00	1,224	1,110	0,114	9,231			<i>Krevní strana</i>			
17	5:30	1,226	1,094	0,132	10,714	1	0:00	0,999	0,532	0,467	38,324
18	6:00	1,236	1,100	0,136	11,044	2	5:00	1,062	0,706	0,356	29,176
19	6:30	1,230	1,082	0,148	12,033	3	10:00	1,160	0,878	0,282	23,077
20	7:00	1,220	1,054	0,166	13,516	4	14:00	1,152	0,869	0,283	23,159
						5	25:00	1,158	0,913	0,245	20,027



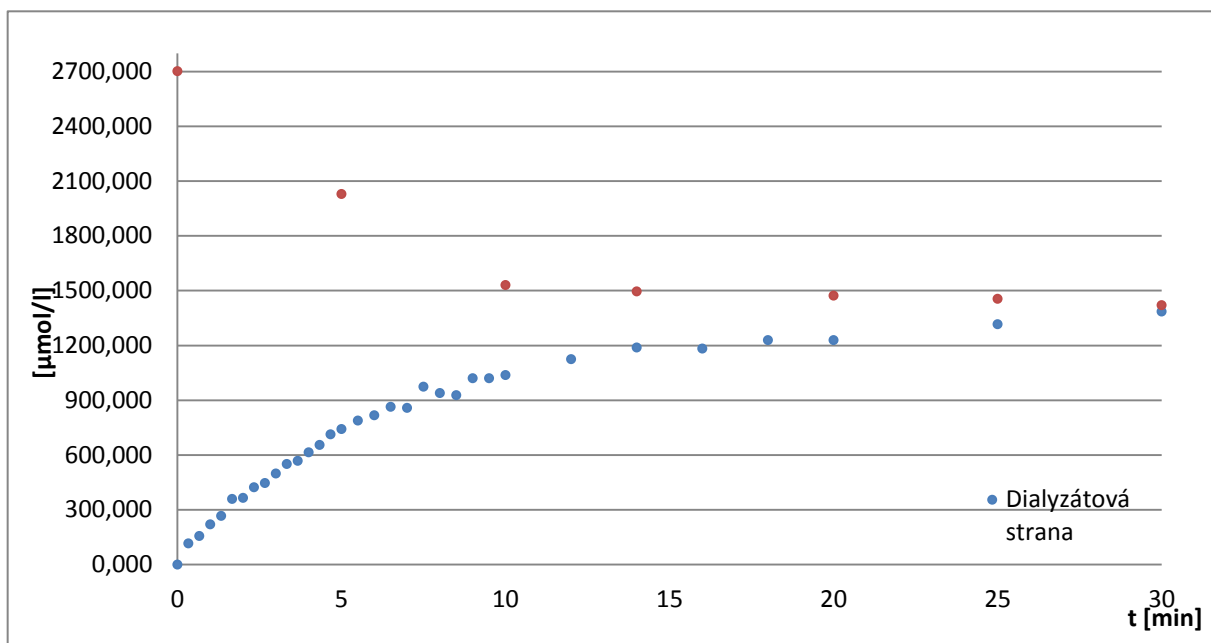
Graf 6.3 Průběh koncentrace urey v časovém schématu 0 min – 25 min



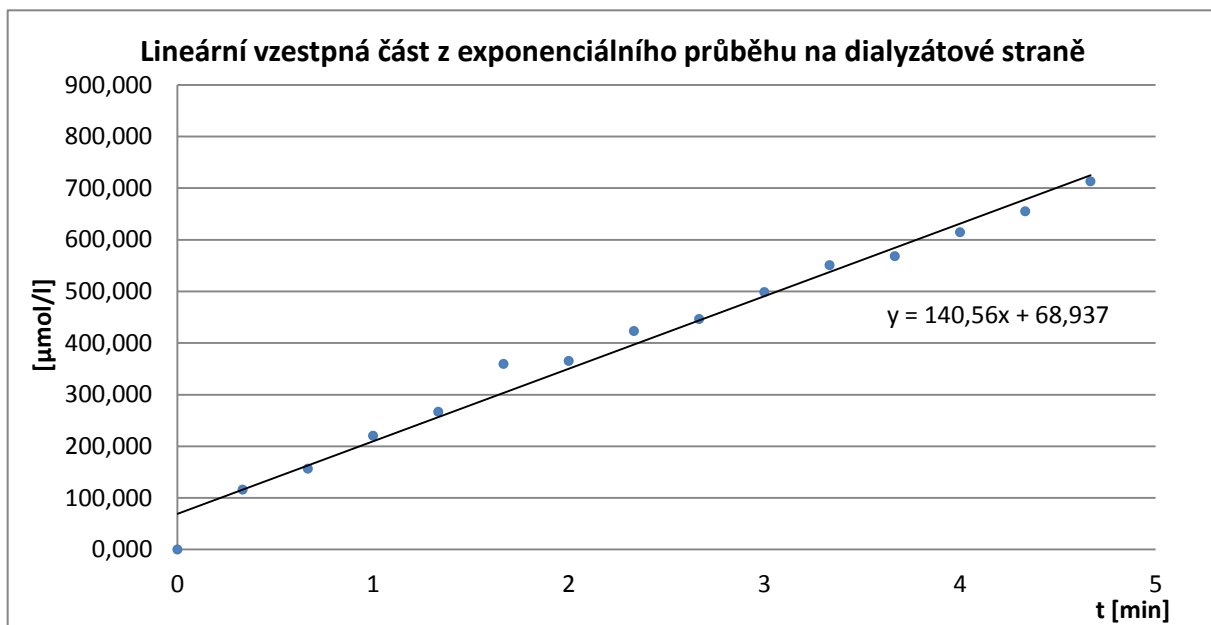
Graf 6.4 Lineární vzestupná část exponenciálního vzestupu koncentrace urey na dialyzátové straně

Tabulka 6.3 Měření č. 3: naměřené hodnoty koncentračního průběhu kreatininu v časovém schématu 0 min – 30 min

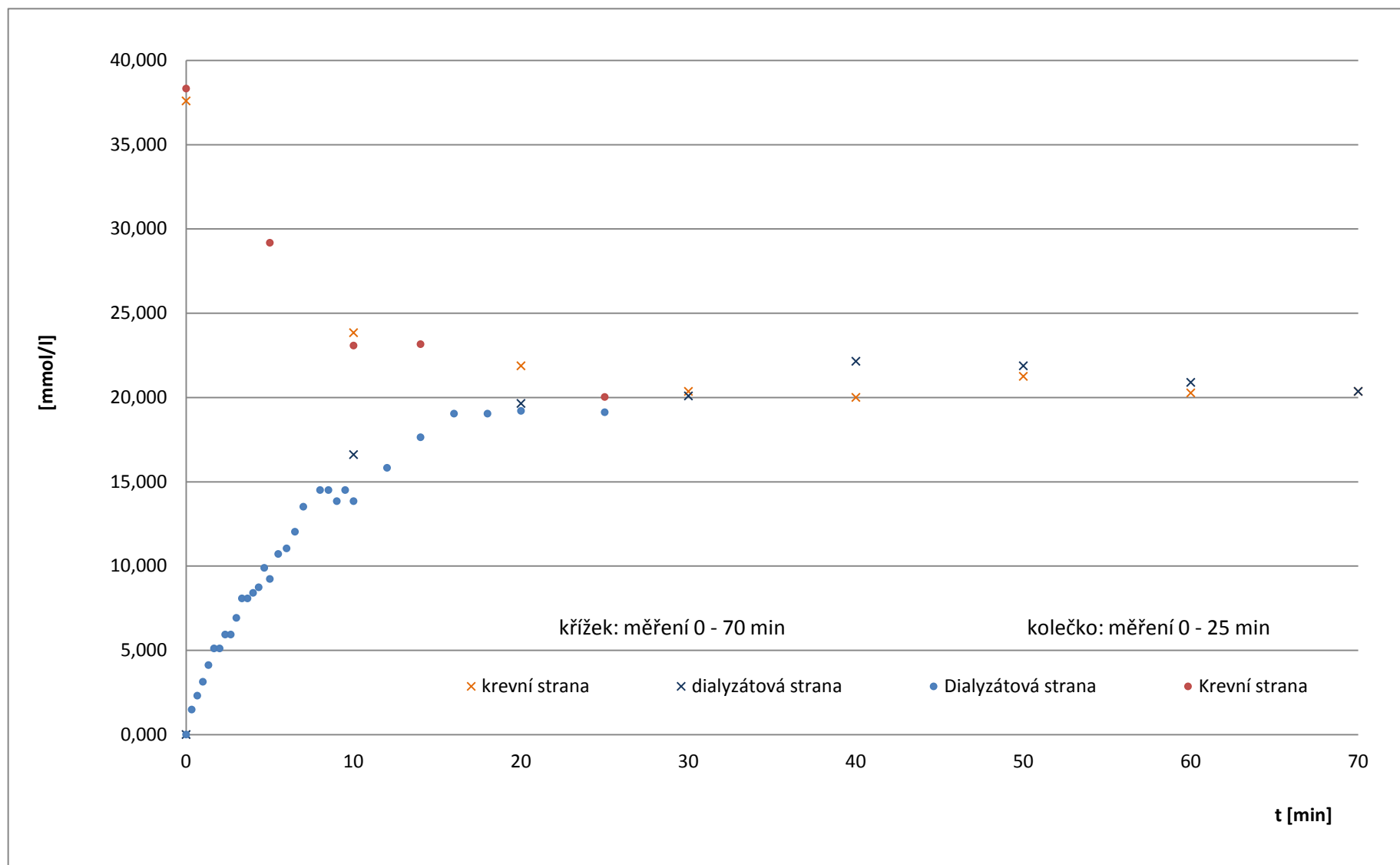
		A 1 min	A 2 min	rozdíl Δ A	c [μmol/l]						
Blank		0,290	0,300	0,010	400						
Standard		0,430	0,509	0,079							
Pořadí odběru:	čas odběru vzorku [min:s]	A 1 min	A 2 min	rozdíl Δ A	c [μmol/l]	Pořadí odběru:	čas odběru vzorku [min:s]	A 1 min	A 2 min	rozdíl Δ A	c [μmol/l]
Dialyzátová strana											
1	0:00	0,277	0,280	0,003	0,000	21	7:30	0,669	0,847	0,178	973,913
2	0:20	0,314	0,344	0,030	115,942	22	8:00	0,653	0,825	0,172	939,130
3	0:40	0,349	0,386	0,037	156,522	23	8:30	0,633	0,803	0,170	927,536
4	1:00	0,360	0,408	0,048	220,290	24	9:00	0,668	0,854	0,186	1020,290
5	1:20	0,389	0,445	0,056	266,667	25	9:30	0,628	0,814	0,186	1020,290
6	1:40	0,414	0,486	0,072	359,420	26	10:00	0,643	0,832	0,189	1037,681
7	2:00	0,429	0,502	0,073	365,217	27	12:00	0,693	0,897	0,204	1124,638
8	2:20	0,436	0,519	0,083	423,188	28	14:00	0,682	0,897	0,215	1188,406
9	2:40	0,460	0,547	0,087	446,377	29	16:00	0,783	0,997	0,214	1182,609
10	3:00	0,460	0,556	0,096	498,551	30	18:00	0,760	0,982	0,222	1228,986
11	3:20	0,492	0,597	0,105	550,725	31	20:00	0,748	0,970	0,222	1228,986
12	3:40	0,505	0,613	0,108	568,116	32	25:00	0,709	0,946	0,237	1315,942
13	4:00	0,520	0,636	0,116	614,493	33	30:00	0,795	1,044	0,249	1385,507
14	4:20	0,536	0,659	0,123	655,072	Krevní strana					
15	4:40	0,568	0,701	0,133	713,043	1	0:00	1,258	1,734	0,476	2701,449
16	5:00	0,582	0,720	0,138	742,029	2	5:00	1,094	1,454	0,360	2028,986
17	5:30	0,579	0,725	0,146	788,406	3	10:00	0,882	1,156	0,274	1530,435
18	6:00	0,608	0,759	0,151	817,391	4	14:00	0,844	1,112	0,268	1495,652
19	6:30	0,589	0,748	0,159	863,768	5	20:00	0,844	1,108	0,264	1472,464
20	7:00	0,623	0,781	0,158	857,971	6	25:00	0,833	1,094	0,261	1455,072
						7	30:00	0,829	1,084	0,255	1420,290



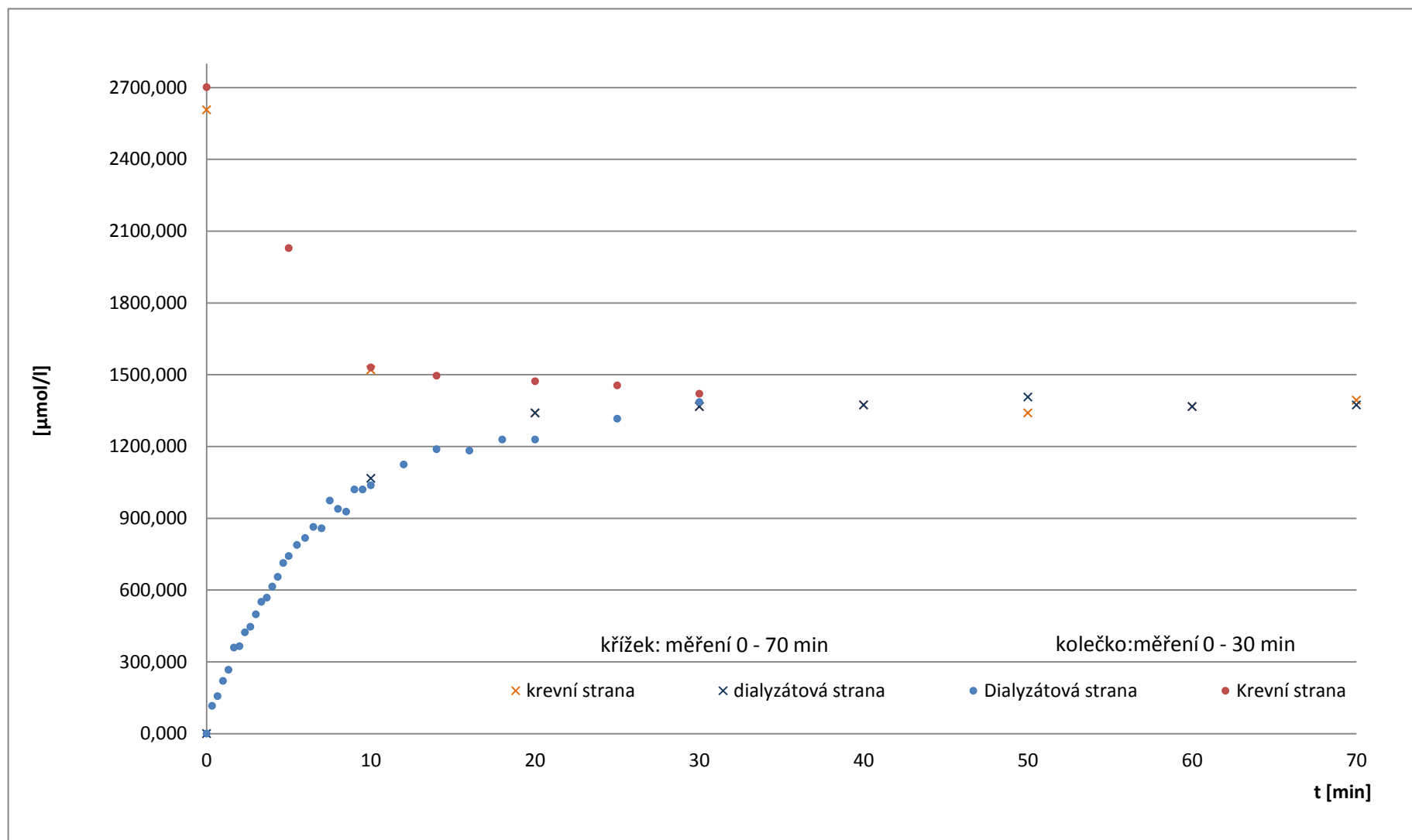
Graf 6.5 Průběh koncentrace kreatininu v časovém schématu 0 min – 30 min



Graf 6.6 Lineární vzestupná část exponenciálního vzestupu koncentrace urey na dialyzátové straně



Graf 6.7 Souhrnný graf 1. a 2. měření pro látku urea



Graf 6.8 Souhrnný graf 1. a 3. měření pro látku kreatinin

7 Diskuse

Uvedené teoretické i praktické poznatky jsou součástí komplexního postupu pro experimentální stanovení propustnosti dialyzační membrány v laboratorním prostředí a umožňují posouzení účinnosti použité membrány.

V rámci měření byla použita plochá dialyzační membrána Cuprophane. Bližší technická specifikace konkrétního použitého kusu k dispozici není. Z obecných znalostí je známo, že Cuprophane byl dříve nejčastěji užívanou dialyzační membránou v klinické praxi a jak uvádí kapitola 3.2.1, řadí se mezi klasické low-flux membrány. Obrázek 2.4 ukazuje charakteristický průběh závislosti prosévacího koeficientu na velikosti molekulové hmotnosti sledované látky. Z této charakteristiky lze odečíst, že klasická LF membrána je neomezeně propustná pro látky do $m_u \cong 250 \text{ Da}$. A celkové propouštění látky do molekulové hmotnosti $\cong 30000 \text{ Da}$. V rámci měření byly použity dvě sledované látky: látka urea o molekulové hmotnosti 60 Da a látka kreatinin o molekulové hmotnosti 113 Da . Teoretickým předpokladem je, že pro obě tyto látky by membrána měla vykazovat velmi podobnou hodnotu propustnosti, (pro ureu mírně vyšší).

Vypočítané hodnoty:

$$K_{\text{urea}} = -1,088307476 \frac{\text{m}}{\text{min}},$$
$$K_{\text{kreatinin}} = -1,0861286 \frac{\text{m}}{\text{min}}.$$

Kvantitativně vychází hodnoty dle předpokladů, záporné znaménko značí pouze směr přestupu látky, a to z krevní do dialyzátové vsádky. Hodnota součinitele prostupu hmoty není v dostupných zdrojích publikovanou hodnotou. Z dostupných zdrojů také nelze určit, jaké hodnoty by měla daná experimentální aparatura za daných podmínek vykazovat nebo jaké přesnosti lze dosáhnout.

Pro další analýzu získaného výsledku však lze hodnotu součinitele prostupu dané látky přepočítat na hodnotu clearance dané aparatury pro danou sledovanou látku:

Clearance experimentální aparatury pro ureu:

$$K_{\text{urea}} \cdot A \cdot 10^6 = 4749 \frac{\text{ml}}{\text{min}}.$$

Clearance experimentální aparatury pro kreatinin:

$$K_{\text{kreatinin}} \cdot A \cdot 10^6 = 4740 \frac{\text{ml}}{\text{min}}.$$

Z uvedených hodnot clearance již lze konstatovat, že ač jsou hodnoty clearance podobné, nenachází se v oblasti hodnot dosahovaných low-flux dialyzačními membránami používanými v klinické praxi. Hodnotu clearance pro ureu a kreatinin pro low-flux dialyzátor popisuje Obrázek 2.6. Z obrázku vyplývá, že při použitém průtoku 300 ml/min na krevní straně by se hodnota clearance pro obě látky měla pohybovat v okolí $200 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$. Současné moderní low-flux dialyzační přístroje s polysulfonovou kapilární dialyzační membránou vykazují hodnotu clearance při průtoku 300 ml/min na krevní straně v rozmezí

(217 až 258) $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$ pro látku urea a (181 až 234) $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$ pro látku kreatinin, viz Příloha G. Je třeba zdůraznit, že srovnávání hodnoty clearance experimentální aparatury a reálného dialyzátoru jsou pouze hrubě orientační. V experimentální aparatuře byl průtok na krevní a dialyzátové straně stejný, tedy 300 ml/min, v reálném dialyzátoru je průtok na dialyzátové straně vždy vyšší, obvykle 500 ml/min. Další hledisko, jehož vliv na výsledný výsledek by mohl být studován dalšími experimenty, je vliv viskozity použitých roztoků. Při práci s experimentální aparaturou byla viskozita roztoku brána jako viskozita vody při 37 °C. Faktory, na kterých hodnota clearance závisí, jsou popsány v kapitole 2.3.

Studie membrány pomocí výše zmíněného a použitého způsobu slouží k posouzení propustnosti membrány pro dané uremické toxiny při transportu látek pouhou difúzí, bez přidání konvektivní složky. Konvektivní složka by byla v tomto druhu měření nežádoucí, protože by znamenala nenulový TMP. V případě podtlaku na dialyzátové straně by byl transport sledovaných látek konvektivní složkou urychlován a kvantitativní analýzu propustnosti membrány by to znehodnotilo.

Na základě výše popsaného postupu tedy lze stanovit propustnost vložené dialyzační membrány. Posuzovat získané hodnoty lze pouze s hodnotami clearance z klinické praxe. Z uvedeného měření plyne závěr, že hodnota clearance vyšla přibližně 20 x vyšší pro obě sledované látky. Existuje řada faktorů, které mohou výsledek měření významně ovlivnit, a na každou tuto problematiku by mohla být uskutečněna nová studie. Mezi jeden z hlavních faktorů patří i kvalita použité membrány. Kvalitu může ovlivnit doba a místo skladování a mnoho dalších okolních vlivů. Nejlépe se tento faktor eliminuje tím, že je membrána odebrána přímo z výroby, ve vakuovém balení, s veškerou možnou technickou specifikací, kterou lze výrobou definovat. Zde však přichází další otázka dostupnosti plochých membrán v době, kdy je většina výroby soustředěna na výrobu membrán kapilárních. Do oblasti dalšího výzkumu či experimentální činnosti s danou aparaturou se mohou zahrnout všechny dialyzační membrány (nebo potencionální membránové materiály), které budou v ploché konfiguraci o minimálním rozměru (7 x 12) cm.

Parametrem, který může ovlivňovat výsledek měření, jsou vzduchové bubliny, které ulpívají v membránové opěrce. Před samotným měřením je snaha bubliny co nejvíce vytěsnit prvotním spuštěním, kdy v krevní i dialyzátové vsádce je pouze destilovaná voda. Není však vyloučeno, že se bubliny nemohou dostat do měřicí cely v průběhu měření.

Závěr

Cílem této práce bylo seznámit se s principy dialyzační léčby, dialyzačními membránami a možnostmi stanovovat propustnost dialyzačních membrán v laboratorním prostředí. Sled informací v jednotlivých kapitolách této bakalářské práce je postaven tak, aby byl nejprve uveden komplexní pohled na celou problematiku. Postupně navazuje podrobný rozbor jednotlivých dílčích částí teoretického a poté praktického charakteru.

První až třetí kapitola obsahuje obecný teoretický úvod. V první kapitole byl probrán krátký úvod do léčby hemodialýzou, historický vývoj dialyzátorů a srovnání se současnou úrovní dialyzační techniky. Navazující kapitola základních pojmů objasnila mechanismy prostupu látek polopropustnou membránou při dialýze, tedy prostou difúzi látek a difúzi ve spojení s konvektivní složkou. Zároveň jsou zde popsány děje, které prostup látek membránou doprovázejí. Třetí kapitola se zaměřuje na problematiku dialyzačních membrán. Je v ní rozdělení základních membránových materiálů a charakteristik membrán důležitých pro vývoj membrán nových.

Od čtvrté kapitoly navazuje praktická část, která se skládá z formulace návrhu experimentální aparatury, jejího sestavení, přípravy na měření, provedení potřebného počtu měřicích cyklů, vyhodnocení naměřených hodnot a v závěru zhodnocení celého postupu i získaných hodnot.

Ve čtvrté kapitole je formulován postup, umožňující experimentálním způsobem stanovovat propustnost dialyzačních membrán v laboratorním měřítku. Specifikují se zde jednotlivé komponenty, ze kterých je experimentální aparatura následně sestavena. Důležitým bodem je i výběr měřicího režimu, ve kterém byla experimentální aparatura spuštěna. Možné měřicí režimy – stacionární a nestacionární režim měření – znázorňují principiální bloková schémata.

Pátá kapitola podrobně popisuje přípravu na měření. Uvádí postup při spektrofotometrické analýze odebraných vzorků, odvození výpočtového vztahu pro výpočet součinitele prostupu hmoty a simulaci koncentračního průběhu dle odvozených výpočtových rovnic v prostředí programu Simulink.

Jednotlivé kroky realizace měření jsou popsány v kapitole šesté. Po provedení potřebného počtu měřicích cyklů spojených s odběrem vzorků, následuje spektrofotometrická analýza. Výstupem spektrofotometrické analýzy jsou hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků, ze kterých se vypočítá hodnota koncentrace. Všechny hodnoty jsou zaznamenány v tabulkách. Koncentrační průběhy na krevní a dialyzátové straně v závislosti na čase jsou vyneseny do grafů. Hlavní pozornost je soustředěna na koncentrační průběh na dialyzátové straně, konkrétně na oblast, kde je vzestup lineární, tato část je vynesena do zvláštního grafu a je zobrazena rovnice regrese. Ze získaných hodnot je vypočítán součinitel prostupu sledovaných látek, podle kterého se posuzuje propustnost membrány pro tyto látky.

Závěrečné zhodnocení praktické části bakalářské práce a diskusi získaných výsledků shrnuje kapitola poslední. Na závěr jsou uvedeny i náměty na další experimentální měření, které by mohly na tuto práci navazovat.

Seznam literatury

- [1] JÖRRES, Achim, Claudio RONCO a John A. KELLUM. *Management of acute kidney problems*. Berlin: Springer, 2010, 681 p. ISBN 978-3-540-69413-7.
- [2] DAUGIRDAS, John T. a Todd S. ING. *Handbook of dialysis*. 1st ed. Boston: Little, Brown, 1988, 566 p. ISBN 03-161-7382-7.
- [3] STREICHER, E. a G. SEYFFART. *Highly permeable membranes*. Basel: Karger, 1985. 186 p. ISBN 3805539940.
- [4] LEE, K.H., D.J. KIM, B. G. MIN a S.H. LEE. Polymeric nanofiber web-based artificial renal microfluidic chip. *Biomed Microdevices*, pp. 435-442, 2007.
- [5] KOVÁČ, Alexandr. *Hemodialyzačná liečba v praxi*. Banská Bystrica: BB, spol. s r. o., 1993. 320 s. ISBN 80-217-0510-8.
- [6] NISSENSON, A. R., C. RONCO, G. PERGAMIT a M. EDELSTEIN. The Human Nephron Filter: Toward a Continuously Functioning Implantable Artificial Nephron System. *Blood Purif*, n. 23, pp. 269-274, 2005.
- [7] VIKLICKÝ, Ondřej, Libor JANOUŠEK a Petr BALÁŽ. *Transplantace ledviny v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008. 380 s. ISBN 978-80-247-2455-3.
- [8] TESAŘ, Vladimír a Otto SCHÜCK. *Klinická nefrologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 650 s. ISBN 80-247-0503-6.
- [9] TEPLAN, Vladimír. *Praktická nefrologie*. 2. vyd. Praha: Grada, 2006, 496 s. ISBN 80-247-1122-2.
- [10] SULKOVÁ, Sylvie. *Hemodialýza*. Praha: Maxdorf-Jessenius, 2000. 693 s. ISBN 80-85912-22-8.
- [11] OPATRNÝ, Karel. *Biokompatibilita dialyzačních membrán*. Plzeň: Euroverlag, 2000. 174 s. ISBN 80-7177-506-1.
- [12] Statistická ročenka dialyzační léčby v České republice 2010. RYCHLÍK, Ivan a František LOPOT. *Česká nefrologická společnost* [online]. 31. 12. 2010 [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: http://www.nefrol.cz/resources/upload/data/275_Prehled_zakl_udaju2010.pdf

- [13] Hemodialýza: Dialyzační systém 5008. *Fresenius medical care* [online]. 2006 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: <http://www.fresenius.cz/Produkt.aspx?global=346&globalkod=ODBVERPRODKATPROD&kod=ODBVERPRODKAT&root=ODBVER&sub=ODBVERPRODKAT&cname=Hemodial%C3%BDza>
- [14] Hemodialysis: Hemofiltration. *Advanced renal education program* [online]. 2006 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: <http://www.advancedrenaleducation.com/Hemodialysis/ModalitiesofTherapy/ExtracorporealMo/Hemofiltration/tabid/199/Default.aspx>
- [15] Oběhový termostat ED-5. *Maneko: laboratorní přístroje a technika* [online]. [cit. 2012-05-16]. Dostupné z: <http://www.maneko.cz/obehovy-termostat-ed-5/>
- [16] DASTYCH, Milan a Petr BREINEK. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 232 s. ISBN 978-802-1045-729.
- [17] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007, 906 s. ISBN 978-802-4614-236.
- [18] MÍKA, Vladimír. *Chemické inženýrství II*. 2. přepr.vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999, 310 s. ISBN 80-708-0359-2.
- [19] ECK, Vladimír a Miroslav RAZÍM. *Biokybernetika*. Vyd. 1. Praha: ČVUT, 1996, 150 s. ISBN 80-010-1445-2.
- [20] ULRYCH, Emil a Martin POLÁK. *Hydromechanika*. Vyd. 3., upr. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2009, 152 s. ISBN 978-80-213-1925-7.
- [21] Brochure Product range of dialysis disposables - B. Braun: Technical Data Diacap Polysulfone low flux. *Medical Expo Catalog Search* [online]. 2009 [cit. 2012-05-20]. Dostupné z: http://pdf.medicaexpo.com/pdf/b-braun/brochure-product-range-of-dialysis-disposables/70984-70818_10.html

Seznam veličin

A	absorbance	[-]
A	účinná plocha membrány	[m ²]
c	koncentrace	[mol·l ⁻¹ , mol·m ⁻³]
c _B	koncentrace sledované látky v krevní vsádce	[mol·l ⁻¹ , mol·m ⁻³]
c _D	koncentrace sledované látky v dialyzátové vsádce	[mol·l ⁻¹ , mol·m ⁻³]
C	clearance	[ml·min ⁻¹]
D	difuzivita	[m ² ·s ⁻¹]
J	hustota toku	[mol·m ⁻² ·s ⁻¹]
K	součinitel prostupu hmoty	[m·s ⁻¹]
KA	clearance dialyzátoru, při transportu látek přes dialyzační membránu prostou difúzí	[ml·min ⁻¹]
Kuf	koeficient ultrafiltrace	[ml·h ⁻¹ ·mmHg ⁻¹]
m	hmotnost	[kg]
M	molární hmotnost	[kg·mol ⁻¹]
Re	Reynoldsovo číslo	[-]
S	sieving coefficient – prosévací koeficient	[-]
v	rychlost	[m·s ⁻¹]
ν	kinematická viskozita	[m ² ·s ⁻¹]
V	objem	[l, dm ³]

Seznam zkratek

D	dialyzátová strana
DEAE	di-etyl-amino-etylén
K	krevní strana
HD	hemodialýza
HDF	hemodiafiltrace
HF	užívá se jako zkratka: hemofiltrace i high-flux membrán
UTF	ultrafiltrace
UFR	ultrafiltration rate – ultrafiltrační rychlost
TMP	transmembránový tlak
TC	termočláňková sonda
PS, PES	polyethersulfon
p.a.	pro analýzu, velmi čistá látka (chemikálie) pro přesné stanovování
PAN	polyakrylonitril
PMMA	polymethylmetakrylát
RRT	renal replacement therapy – náhrada funkce ledvin

Seznam příloh

- Příloha A Obsah přiloženého CD
- Příloha B Pracovní návod BIO-LA-TEST[®] Močovina Liquid 250 S
- Příloha C Pracovní návod BIO-LA-TEST[®] Kreatinin Liquid 500 S
- Příloha D Pracovní návod Kreatinin urine standard
- Příloha E Kopie tištěných výstupů ze spektrofotometru
- Příloha F Farmakokinetické modely v perfúzním zobrazení (kapitola 2.1)

(Příloha F je převzata z nepublikovaného elektronického dokumentu:
Pharmacokinetics models in perfusion Imaging, Radovan Jiřík, 2010, str. 5 -6)

- Příloha G Technická specifikace kapilární low-flux dialyzační membrány [21]

Příloha A OBSAH PŘÍLOŽENÉHO CD

Elektronická verze práce

Elektronická verze práce ve formátu PDF je k dispozici v kořenovém adresáři příloženého CD pod názvem *Martina_Vesela_BP.pdf*

Zdrojové texty

Zdrojové texty jsou uloženy v adresáři *Zdrojové texty*. První znak souboru je písmeno, které náleží danému pořadí textu v seznamu příloh. Příloha F je nepublikovaný elektronický dokument ve formátu PDF, ze kterého byla použita pouze kapitola (2.1).

Obrázky publikované v technické zprávě

Všechny obrázky, které jsou publikovány v technické zprávě, jsou uloženy v adresáři *Obrázky*. Název souboru začíná číslem, které koresponduje s číslem obrázku v technické zprávě. Obrázky, které se vyskytují mimo vlastní text, jsou uloženy pod názvem: *Příloha E_Kopie tištěných výstupů ze spektrofotometru.jpg* a *Příloha G_Technická specifikace kapilární low-flux dialyzační membrány [21].bmp*

Realizovaný program

V adresáři *Program* je uložen realizovaný simulátor. Ke spuštění programu je potřeba mít nainstalované prostředí MATLAB® 2009b.

Nejprve je nutné otevřít a spustit simulaci v Simulinku (Simulink Model: *simulace_podle_vztahu_5_46_a_5_47.mdl* a *simulace_podle_dif_rov_5_17_a_5_18.mdl*), do Workspace se uloží struktura ScopeData, pak lze spustit skript: *vykresleni_prubehu.m*, který výsledný průběh vykreslí (lze použít pro vykreslení výsledných průběhů z obou simulací). Výsledný průběh ze skriptu *vykresleni_prubehu.m* je uložen i ve složce *Obrázky* jako: *5.4_Výstup simulací - průběhy koncentrací c_B (t) a c_D (t).emf*.

Příloha B PRACOVNÍ NÁVOD BIO-LA-TEST® MOČOVINA LIQUID 250 S

BIO-TEST®



MOČOVINA Liquid 250 S (UREA L 250 S)

Kat. č. 10003309

Skladovat (+2 až +8) °C

Souprava k enzymatickému stanovení močoviny v séru, plazmě a moči kineticky.

Princip metody



Činidla

R1 Enzymy	4x60 ml
Trís pufr pH 7,8	120 mmol/l
ADP	0,75 mmol/l
ureasa	≥ 667 jkat/l
GLDH	≥ 6,7 jkat/l
R2 Substrát	1x60 ml
2-oxoglutarát	25 mmol/l
NADH	1,2 mmol/l
R3 Standard	2x3 ml
Močovina	15 mmol/l

Smíšení směsí R1 + R2

Trís pufr pH 7,8	96 mmol/l
ADP	0,6 mmol/l
ureasa	≥ 534 jkat/l
GLDH	≥ 5,4 jkat/l
2-oxoglutarát	5 mmol/l
NADH	0,24 mmol/l

Připrava a stabilizace pracovních roztoků

Dvoureagenční metoda – start substrátem

Činidla R1, R2 a R3 jsou kapalná a určena k přímému použití. Skladována před i po otevření při (+2 až +8) °C a chráněna před světlem a kontaminací jsou stabilní do doby expirace vyznačené na obale.

Jednoreagenční metoda – start vzorkem

Pracovní roztok se připraví smícháním 4 dílů činidla R1 s 1 dílem činidla R2.

Stabilita: 5 dní při (+15 až +25) °C v temnu

4 týdny při (+2 až +8) °C v temnu

Vzorky

Nehemolytické sérum, plazma (nepoužívat amonium heparinát), čerstvá moč.

Stabilita močovin v séru a plazmě je 2 týdny při (+4 až +8) °C, v moči 1 týden při (+4 až +8) °C.

Kalibrace

Ke kalibraci se doporučuje Lyonorm Kalibrátor, kat. č. 10003200 nebo standard, který je součástí soupravy.

Kontrola kvality

Ke kontrole se doporučuje:

Lyonorm HUM N, kat. č. 10003204

Lyonorm HUM P, kat. č. 10003206.

Postup měření

Vínová díška	334, 365, 340 mm
Kveta	1 cm
Teplota	37 °C
Objemový poměr sérum/reakční směs (start substrátem)	1/125
Objemový poměr sérum/reakční směs (start vzorkem)	1/101

Objem pracovních roztoků a vzorků lze měnit, pro garant analytických parametrů však jejich vzájemný poměr musí být zachován.

Dvoureagenční metoda – start substrátem

	Blank činidla	Standard (kalibrátor)	Vzorek
Činidlo 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Vzorek	–	–	0,010 ml
Standard (kalibrátor)	–	0,010 ml	–
Destilovaná voda	0,010 ml	–	–
Promíchá se a po inkubaci 1 min. se přidá:			
Činidlo 2	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
Promíchá se, odečte se počáteční absorbance po 30 s (A_0), a začne se měřit čas. Znovu se odečte absorbance přesně po 1 minutě (A_1). Měří se proti blanku činidla. Vypočítá se změna absorbance $\Delta A_1 = (A_1 - A_0)$ za min.			

Jednoreagenční metoda – start vzorkem

	Blank činidla	Standard	Vzorek
Pracovní roztok	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Vzorek	–	–	0,010 ml
Standard	–	0,010 ml	–
Destilovaná voda	0,010 ml	–	–
Promíchá se, odečte se počáteční absorbance po 30 s. a začne se měřit čas. Znovu se odečte absorbance přesně po 1 minutě. Měří se proti blanku činidla. Vypočítá se změna absorbance $\Delta A_1 = (A_1 - A_0)$ za min.			

Aplikace na automatické analyzátoři jsou dodávány na vyžádání.

Výpočet

$$\text{Močovina (mmol/l)} = \frac{\Delta A_{\text{uv}} - \Delta A_{\text{bl}}}{\Delta A_{\text{st}} - \Delta A_{\text{bl}}} \times C_{\text{st}}$$

C_{st} = koncentrace kalibrátoru (standardu)

Přepočet jednotek

1 mmol/l = 0,167 mg/dl

močovina (mmol/l) x 0,467 = BUN (mmol/l)

BUN (mmol/l) x 2,14 = močovina (mmol/l)

Referenční hodnoty

fs Močovina (mmol/l) muž 2,8–8,0

fs Močovina (mmol/l) ženy 2,0–6,7

dU Močovina (mmol/24 hod) 167–583

Referenční rozsah je pouze orientační, doporučuje se, aby si každá laborator ověřila rozsah referenčního intervalu pro populaci, pro kterou zajišťuje laboratorní vyšetření.

Výkonnostní charakteristiky

Linearita: do 50 mmol/l

Mez detekce: 0,12 mmol/l

Dolní mez stanovitelnosti: 0,4 mmol/l

Pracovní rozsah: 0,4–50 mmol/l

Přesnost (při 37 °C)

INTRA-ASSAY n = 20	Průměr (mmol/l)	SD (mmol/l)	CV (%)
Vzorek 1	7,47	0,11	1,53
Vzorek 2	25,47	0,24	0,96
Vzorek 3	33,45	0,25	0,73
INTER-ASSAY n = 10	Průměr (mmol/l)	SD (mmol/l)	CV (%)
Vzorek 1	7,45	0,18	2,43
Vzorek 2	24,79	0,41	1,63
Vzorek 3	33,13	0,41	1,25

Pravidlost

Bias

+5,7% (7,13 mmol/l)

Srovnání s komerčně dostupnou metodou

Lineární regrese:

n = 100, r = 0,999, y = 1,002 x - 0,126 mmol/l

Interferenze

Následující analyty neinterferují:

kyselina askorbová do 1,7 mmol/l, bilirubin do 1 mmol/l, triglyceridy do 22,6 mmol/l (2000), hemoglobin do 5 g/l, glukóza do 27 mmol/l.

Poznámka

1. Přesnější koncentrace močoviny 50 mmol/l, ředíme vzorek destilovanou vodou 1 + 1 a násobíme 2x.

2. V případě stanovení v moči ředte vzorek destilovanou vodou v poměru 1 + 100 a výsledek násobíte 101x.

Bezpečnostní charakteristiky

Určeno pro in vitro diagnostické použití oprávněnou a profesionálně vyškolenou osobou. Činidla soupravy nejsou klasifikována jako nebezpečná.

První pomoc

Při náhodném požití vypláchnout ústa a vypít asi 0,5 l vody, při vniknutí do oka provést rychlý a důkladný výplach proudem čisté vody. Při požití omytí omytí, pokožku teplem vodou a mýdlem. Ve vážných případech poškození zdraví vyhledat lékařskou pomoc.

Nakládání s odpady

Na všechny zpracované vzorky je nutno pohlížet jako na potenciálně infekční a spolu s případnými zbytky činidel je likvidovat podle vlastních interních předpisů jako nebezpečný odpad v souladu se Zákonem o odpadech. Papírové a ostatní obaly se likvidují podle druhu materiálu jako tříděný odpad (papír, sklo, plasty).

Literatura

1. Kassirer, J. P.: New. Eng. J. Med. 285, p. 385, 1971.
2. Talke, H., Schubert, G. E.: Klin. Wochenschr., 43, p. 174 1965.
3. Tietz, N. W.: Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd, edition, p. 676–679, 1987, W. B. Saunders Company Philadelphia.
4. Zima, T.: Laboratorní diagnostika, Galén (2002).

Datum poslední revize: 13. 12. 2010

Příloha C PRACOVNÍ NÁVOD BIO-LA-TEST® KREATININ LIQUID 500 S

BIO-TEST®



KREATININ LIQUID 500

(CREAT L 500)

Kat. č. 10010227

Skladovat (+2 až +8)°C

Souprava pro stanovení koncentrace kreatininu v séru, plazmě a moči Jaffého metodou.

Princip metody

Kreatinin reaguje v alkalickém prostředí s kyselinou pikrovou za vzniku žluto-oranžového komplexu. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku.

Číslníka

R1 4 x 100 ml	
Hydroxid sodný	0,24 mol/l
R2 1 x 100 ml	
Kyselina pikrová	26 mmol/l
R3 1 x 10 ml	
Nulový kalibrátor	

Složení reakční směsi

Hydroxid sodný	183 mmol/l
Kyselina pikrová	5 mmol/l

Příprava a stabilita pracovních roztoků

Dvousraženční metoda

Číslníka R1, R2 a R3 jsou kapalná a určená k přímému použití. Skladovaná před otevřením při (+2 až +8)°C a chráněná před světlem jsou stabilní do data expirace, uvedeného na obalu. Po otevření jsou číslníka R1 a R2 skladovány při (+2 až +8)°C a chráněná před světlem a kontaminaci stabilní do data expirace, uvedeného na obalu.

Jednousraženční metoda

Pracovní roztok se připraví smícháním 4 dílů číslníka R1 a 1 dílu číslníka R2.

Stabilita: 1 týden při (+2 až +25)°C v temnu

Vzorky

Nehemolytické sérum nebo plazma (heparin, EDTA), moč. Kreatinin je v séru a plazmě stabilní 1 týden při (+4 až +8)°C, 2 dny při (+20 až +25)°C. Stabilita kreatininu v moči je 4 dny při (+4 až +8)°C.

Kalibrace

Pro stanovení v séru, plazmě se doporučuje lineární dvoubodová kalibrace s použitím Lyonorm kalibrátoru, kat. č. 10003200 a číslníka R3 ze soupravy jako nulového kalibrátoru (viz poznámka 1). Pro stanovení kreatininu v moči se ke kalibraci doporučuje Kreatinin Urine Standard, kat. č. 10010242.

Kontrola kvality

Ke kontrole se doporučuje

Lyonorm HUM N, kat. č. 10003204

Lyonorm HUM P, kat. č. 10003206

Postup měření

Vlnová délka	492 nm (490–510 nm)
Kvanta	1 cm
Teplota	+37°C
Objemový poměr vzorek/reakční směs	1/21
Objem pracovních roztoků a vzorků lze měřit, pro garanci analytických parametrů však jejich vzájemný poměr musí být zachován.	

Dvousraženční metoda

	Reagenční blank	Kalibrátor (Standard)	Vzorek
Číslníka R1	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml
Vzorek	–	–	0,05 ml
Kalibrátor (Standard)	–	0,05 ml	–
Číslníka R3* (Destilovaná voda)	0,05 ml	–	–
Promíchá se a inkubuje 1–5 minut. Poté se přidá:			
Číslníka R2	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Promíchá se, a přesně po 1 minutě inkubace se odečte počáteční absorbance blanku A_{00} , vzorku A_{01} a standardu A_{02} . Přesně po 2 minutách se odečte konečná absorbance blanku A_{00} , vzorku A_{01} a standardu A_{02} . Vypočítá se výsledná změna absorbance blanku, vzorku a standardu za 1 minutu jako rozdíl příslušných konečných a počátečních absorbancí ($\Delta A/min$).

Jednousraženční metoda

	Reagenční blank	Kalibrátor (Standard)	Vzorek
Pracovní roztok	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Vzorek	–	–	0,05 ml
Kalibrátor (Standard)	–	0,05 ml	–
Číslníka R3* (Destilovaná voda)	0,05 ml	–	–

Promíchá se a přesně po 1 minutě inkubace se odečte počáteční absorbance blanku A_{00} , vzorku A_{01} a standardu A_{02} . Přesně po 2 minutách se odečte konečná absorbance blanku A_{00} , vzorku A_{01} a standardu A_{02} . Vypočítá se výsledná změna absorbance blanku, vzorku a standardu za 1 minutu jako rozdíl příslušných konečných a počátečních absorbancí ($\Delta A/min$).

* viz poznámka 1

Aplikace na automatické analyzátoři jsou dodávány na vyžádání.

Výpočet

$$\text{Kreatinin } (\mu\text{mol/l}) = \frac{\Delta A_{\text{vzorek}} - \Delta A_{\text{blank}}}{\Delta A_{\text{kalibrátor}} - \Delta A_{\text{blank}}} \times C_{\text{K}}$$

C_{K} – koncentrace kalibrátoru, standardu

Přepočet jednotek

mg/dl x 88,4 = $\mu\text{mol/l}$

Referenční hodnoty

18 Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	55–110
muži	44–95
ženy	5–18
dJ Kreatinin (mmol/24 hod)	

Referenční rozmezí je pouze orientační, doporučuje se, aby si každá laboratoř ověřila rozsah referenčního intervalu pro populaci, pro kterou zajišťuje laboratorní vyšetření.

Výkonnostní charakteristiky

Linearity: do 3000 $\mu\text{mol/l}$

Mez detekce: 2,33 $\mu\text{mol/l}$

Dolní mez stanovitelnosti: 7,00 $\mu\text{mol/l}$

Pracovní rozsah: 7,00–3000 $\mu\text{mol/l}$

Přesnost (při 37°C)

INTRA-ASSAY n = 20	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)
Vzorek 1	78,71	2,23	2,90
Vzorek 2	330,64	2,76	0,83
Vzorek 3	667,35	11,46	1,72
INTER-ASSAY n = 20	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)
Vzorek 1	78,59	2,65	3,37
Vzorek 2	328,11	3,19	0,97
Vzorek 3	661,53	14,13	2,14

Přesnost

Bias: –2,54% (78,7 $\mu\text{mol/l}$)

–1,01% (334,0 $\mu\text{mol/l}$)

Srovnání: a komerčně dostupnou metodou. Lineární regrese:

$N = 96$, $r = 0,999$, $y = 1,053x - 41,3$ $\mu\text{mol/l}$

Interference

Následující analyty neinterferují:

bilirubin do 250 $\mu\text{mol/l}$, hemoglobin do 10 g/l a triglyceridy do 17 mmol/l.

Poznámka

- Měření koncentrace kreatininu v séru/plazmě Jaffého metodou je zatíženo (zejména v oblasti referenčního intervalu) pozitivní chybou sérové matrice, proto se ke kalibraci doporučuje použít Lyonorm Kalibrátor v kombinaci s nulovým kalibrátorem (číslníka R3), který se použije jako STD1 (blank) místo vody nebo fyziologického roztoku.
- Pro stanovení v moči používáme moč sbíranou v průběhu 24 hodin. Je důležité přesně změřit objem sbírané moči. Moč pro stanovení zředíme destilovanou vodou v poměru 1+19 a výsledek vynásobíme 20x.
- Vzorky séra a plazmy s koncentrací kreatininu nad 3000 $\mu\text{mol/l}$ se ředí v poměru 1+9 fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) a analyza se opakuje. Výsledek se násobí 10x.

Bezpečnostní charakteristiky

Určeno pro in vitro diagnostické použití oprávněnou a profesionálně vyškolenou osobou.

Číslníka soupravy obsahují hydroxid sodný, který je klasifikován jako dráždivý.

Číslníka R1 obsahuje hydroxid sodný, který je klasifikován jako dráždivý.

R 36/38 Dráždí oči a kůži.

S 26 Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

S 37/39 Používejte vhodné ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít.

S 45 V případě úrazu, nebo nechtě-li se dotýkat, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc, je-li možno, ukažte toto označení.

Při práci je třeba dodržovat zásady osobní hygieny, nejlépe, nepít, nekouřit, používat osobní ochranné pracovní pomůcky.

První pomoc

Při náhodném požití vypláchnout ústa a vypít asi 0,5 l vody, při požití pokožky nebo vniknutí do oka provést rychlý a důkladný výplach proudem čisté vody. Ve vážných případech poškození zdraví vyhledat lékařskou pomoc.

Nakládání s odpady

Na všechny zpracované vzorky je nutno pohlížet jako na potenciálně infekční a spolu s případnými zbytky čísel je likvidovat podle vlastních interních předpisů jako nebezpečný odpad v souladu se Zákonem o odpadech.

Papírové a ostatní obaly se likvidují podle druhu materiálu jako tříděný odpad (papír, sklo, plasty).

Literatura

- Myers, G. L., Greg Miller, W., Cornish, J., Fleming, J., Greenberg, N. et al.: Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement, Clin. Chem. 52, 5-18, 2006
- Frídaček, J. B., Program zlepšování kvality měření sérového kreatininu, Klin. Biochem. Metab., 14 (35), No.3, 173-178, 2006
- Bowers, L. D., Wong, E. T.: Clin. Chem. 26, 555, 1980.
- Tietz, N. W.: Textbook Of Clin. Chem., 1245-1250, W. B. Saunders, Co., Philadelphia, 1999.
- Fläcker JFF: Laboratorní zpráva č. 525, Lachema a.s., 1981.

Datum poslední revize: 24. 3. 2011

Příloha D PRACOVNÍ NÁVOD KREATININ URINE STANDARD

BIO TEST®



KREATININ URINE STANDARD

(CREAT U ST)

Kat. č. 10010242

Skládat (+2 až +8) °C

Souprava činidel určená pro kalibraci a kontrolu při stanovení koncentrace kreatininu v moči Jaffého metodou (např. soupravou BLT Kreatinin Liquid 500, kat. č. 10010227).

Činidla

R1 4 x 10 ml
Kreatinin 400 µmol/l

Příprava a stabilita pracovního roztoku

Činidlo R1 je kapaliné a určeno k přímému použití.
Skládat před otevřením při (+2 až +8) °C a chráněné před světlem je stabilní do data expirace, uvedeného na obale.
Po otevření skládat při (+2 až +8) °C a chráněné před světlem a kontaminací je stabilní do data expirace, uvedeného na obale.

Bezpečnostní charakteristiky

Určeno pro in vitro diagnostické použití oprávněnou a profesionálně vyškolenou osobou.
Činidlo soupravy obsahuje zdraví škodlivou kyselinu benzoovou (0,16%), vzhledem k nízkému obsahu této látky není činidlo klasifikováno jako nebezpečné.

První pomoc

Při náhodném požití vypláchnout ústa a vypít asi 0,5 l vody, při poškození pokožky nebo vniknutí do oka provést rychlý a důkladný výplach proudem čisté vody. Ve vážných případech poškození zdraví vyhledat lékařskou pomoc.

Nakládání s odpady

Na všechny zpracované vzorky je nutno pohlížet jako na potenciálně infekční a spolu s případnými zbytky činidel je likvidovat podle vlastních interních předpisů jako nebezpečný odpad v souladu se Zákonem o odpadech.
Papírové a ostatní obaly se likvidují podle druhu materiálu jako tříděný odpad (papír, sklo, plasty).

Literatura

1. Myers, G. L., Greg Miller, W., Coresh, J., Fleming, J., Greenberg, N. et al.: Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement, Clin. Chem. 52, 5-18, 2006
2. Friedecký B., Program zlepšování kvality měření sérového kreatininu, Klin. Biochem. Metab., 14 (35), No.3, 173-176, 2006
3. Bowers, L. D., Wong, E.T.: Clin. Chem. 26, 555, 1980.
4. Tietz, N. W.: Textbook Of Clin. Chem., 1245-1250, W. B. Saunders, Co., Philadelphia, 1999.
5. Fischer Jltf: Laboratorní zpráva č. 525, Lachema a.s., 1981.

Datum poslední revize: 20. 12. 2010

KREATININ URINE ŠTANDARD

(CREAT U ST)

Kat. č. 10010242

Skládat (+2 až +8) °C

Souprava činidel určená na kalibraci a kontrolu při stanovení koncentrace kreatininu v moči Jaffého metodou (např. soupravou BLT Kreatinin Liquid 500, kat. č. 10010227).

Činidla

R1 4 x 10 ml
Kreatinin 400 µmol/l

Příprava a stabilita pracovního roztoku

Činidlo R1 je kapaliné a určeno k přímému použití.
Skládat před otevřením při (+2 až +8) °C a chráněné před světlem je stabilní do data expirace, uvedeného na obale.
Po otevření skládat při (+2 až +8) °C a chráněné před světlem a kontaminací je stabilní do data expirace, uvedeného na obale.

Bezpečnostní charakteristiky

Určeno na in vitro diagnostické použití oprávněnou a profesionálně vyškolenou osobou.
Činidlo soupravy obsahuje zdraví škodlivou kyselinu benzoovou (0,16%), vzhledem k nízkému obsahu této látky není činidlo klasifikováno jako nebezpečné.

První pomoc

Při náhodném požití vypláchnout ústa a vypít asi 0,5 l vody, při poškození pokožky nebo vniknutí do oka vykonat rychlý a důkladný výplach proudem čisté vody. Ve vážných případech poškození zdraví vyhledat lékařskou pomoc.

Zaobcházání s odpady

Na všechny zpracované vzorky je nutné pohlížet jako na potenciálně infekční a spolu s případnými zbytky činidel je likvidovat podle vlastních interních předpisů jako nebezpečný odpad v souladu se Zákonem o odpadech.
Papírové a ostatní obaly se likvidují podle druhu materiálu jako tříděný odpad (papír, sklo, plasty).

Literatura

1. Myers, G. L., Greg Miller, W., Coresh, J., Fleming, J., Greenberg, N. et al.: Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement, Clin. Chem. 52, 5-18, 2006
2. Friedecký B., Program zlepšování kvality měření sérového kreatininu, Klin. Biochem. Metab., 14 (35), No.3, 173-176, 2006
3. Bowers, L. D., Wong, E.T.: Clin. Chem. 26, 555, 1980.
4. Tietz, N. W.: Textbook Of Clin. Chem., 1245-1250, W. B. Saunders, Co., Philadelphia, 1999.
5. Fischer Jiltf: Laboratorní zpráva č. 525, Lachema a.s., 1981.

Datum poslední revize: 20. 12. 2010

Příloha E KOPIE TIŠTĚNÝCH VÝSTUPŮ ZE SPEKTROFOTOMETRU

CECIL CE 3041	
Serial No: 127204	
S/W Version: R0053	
Time: 10:51 26/04/12	
Self test: OK	
Calibration: OK	
SINGLE ML PROGRAM	
CECIL CE 3041	
Kopie tištěného výstupu: UREA	
Serial No: 127204	
S/W Version: R0053	
Time: 11:56 26/04/12	
Bandwidth: 1.8 nm	
Wavelength: 340.0 nm vlnová délka	
Cycle time: 00:00:30 h:m:s délka cyklu	
Operator:	
Reference:	
Sample:	
Sample 1 11:56	
Time	Absorbance
h:m:s	A
00:00:00	1.340
00:00:30	1.342
00:01:00	1.332
00:01:30	1.340
BLANK	
Sample 2 11:59	
Time	Absorbance
h:m:s	A
00:00:00	1.304
00:00:30	1.222
00:01:00	1.128
00:01:30	1.038
STANDARD	
Sample 3 12:03	
Time	Absorbance
h:m:s	A
00:00:00	1.340
00:00:30	1.338
00:01:00	1.356
00:01:30	1.342
DIALYZÁT (t = 0)	
Sample 4 12:23	
Time	Absorbance
h:m:s	A
00:00:00	1.238
00:00:30	0.999
00:01:00	0.756
00:01:30	0.532
KREVNÍ STRANA (t = 0)	

SINGLE ML PROGRAM	
CECIL CE 2502	
Kopie tištěného výstupu: KREATININ	
Serial No: 125743	
S/W Version: R0055	
Time: 00:53 26/04/12	
Bandwidth: 4.0 nm	
Wavelength: 492.0 nm vlnová délka	
Cycle time: 00:01:00 h:m:s délka cyklu	
Operator:	
Reference:	
Sample:	
Sample 1 00:53	
Time	Absorbance
h:m:s	A
00:00:00	0.200
00:01:00	0.250
00:02:00	0.300
BLANK	
Sample 2 00:56	
Time	Absorbance
h:m:s	A
00:00:00	0.310
00:01:00	0.450
00:02:00	0.500
STANDARD	
Sample 3 00:51	
Time	Absorbance
h:m:s	A
00:00:00	0.279
00:01:00	0.277
00:02:00	0.280
DIALYZÁT (t = 0)	
Sample 4 00:18	
Time	Absorbance
h:m:s	A
00:00:00	0.534
00:01:00	1.258
00:02:00	1.734
KREVNÍ STRANA (t = 0)	

Příloha F FARMAKOKINETICKÝ MODEL V PERFÚZNÍM ZOBRAZENÍ (KAPITOLA 2.1, STR. 5-6),

$$R(t) = e^{-\frac{P_b}{V_{b1}}t} * e^{-\frac{P_b}{V_{b2}}t} * \dots * e^{-\frac{P_b}{V_{bn}}t} \quad (12)$$

2 Diffusible Contrast Agents

These models are applied in DCE-MRI, where the contrast agent diffuses out of the vascular space (but not to intramolecular space)

2.1 One-Compartment Model, Permeability-Limited Conditions

Simplification assuming high blood flow. Hence, the contrast-agent kinetics is mostly governed by diffusion through the vascular wall. The extravascular extracellular space (EES), also denoted as the interstitial space, is modeled as one well-mixed compartment within the ROI. The contrast-agent mass in the EES, $M_e(t)$, is then described according to the 1st Fick's law as

$$\frac{dM_e(t)}{dt} = PS_a(AIF(t) - C_e(t)), \quad (13)$$

where PS_a is the permeability – surface area product of the capillary wall within the ROI. Permeability P describes the leakage of the capillary wall (e.g. in m/s) and the surface S (e.g. in m^2) is the blood-wall surface area in the ROI. The product PS_a has the same units as F_{ba} .

Let us apply the following substitutions:

- Conversion of mass $M_e(t)$ to the contrast-agent concentration in the EES:

$$C_e(t) = \frac{M_e(t)}{V_{ea}}, \quad (14)$$

where V_{ea} is volume of the EES in the ROI,

- Conversion of V_{ea} to the EES volume per unity tissue mass V_e (e.g. in ml/100g tissue), which is a usual parameter in perfusion imaging:

$$V_e = \frac{V_{ea}}{V_{ROI}\rho} \quad (15)$$

- Conversion of PS_a to the permeability surface area product per unity tissue mass PS (given e.g. in ml/min/100g tissue), which is a usual parameter in perfusion imaging:

$$PS = \frac{PS_a}{V_{ROI}\rho}. \quad (16)$$

Then, the differential equation changes to

$$V_e \frac{dC_e}{dt} = PS(AIF(t) - C_e(t)). \quad (17)$$

Using Laplace transform, the analytical solution is derived as

$$\begin{aligned}
V_e s C_e(s) &= PS(AIF(s) - C_e(s)) \\
C_e(s) &= \frac{PS}{V_e} AIF(s) \frac{1}{s + \frac{PS}{V_e}} \\
C_e(t) &= \frac{PS}{V_e} AIF(t) * e^{-\frac{PS}{V_e} t}.
\end{aligned} \tag{18}$$

Relating $C_e(t)$ to the measured curve, contrast-agent concentration in the ROI $C(t)$ as

$$C_e(t) = C(t) \frac{V_{ROI}}{V_{ca}} = C(t) \frac{1}{V_e \rho}, \tag{19}$$

the final equation is

$$C(t) = \rho PS AIF(t) * e^{-\frac{PS}{V_e} t}. \tag{20}$$

2.2 One-Compartment Model, Flow-Limited Conditions

Simplification assuming highly permeable capillary wall in the ROI. Hence, the contrast-agent kinetics is mostly governed by blood wall. The EES is modeled as one well-mixed compartment within the ROI (Fig. 4). $M_e(t)$ is then described as

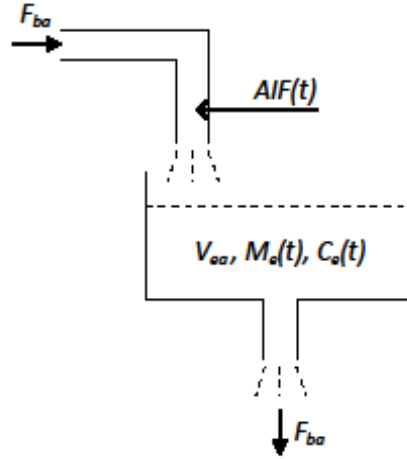


Figure 4: One-compartment model for diffusible contrast agents, flow-limited conditions

$$\frac{dM_e(t)}{dt} = F_{ba} AIF(t) - F_{ba} \frac{M_e(t)}{V_{ea}}. \tag{21}$$

Using the above given substitutions,

$$V_e \frac{dC_e(t)}{dt} = F_b AIF(t) - F_b C_e(t). \tag{22}$$

Příloha G TECHNICKÁ SPECIFIKACE KAPILÁRNÍ LOW-FLUX DIALYZAČNÍ MEMBRÁNY [21]

Technical Data

Diacap® α Polysulfone Low Flux Dialysers

In vitro performance	LO PS 10	LO PS 12	LO PS 15	LO PS 18	LO PS 20
Ultrafiltration coefficient (ml/h/mmHg)	6.8	7.9	9.8	12.3	13.7
Clearances: $Q_b = 200\text{ml/min}$					
Urea	176	183	189	192	194
Creatinine	157	166	173	180	183
Phosphate	126	139	146	157	164
Vitamin B ₁₂	68	77	83	100	110
Clearances: $Q_b = 300\text{ml/min}$					
Urea	217	233	246	253	258
Creatinine	181	200	213	225	234
Phosphate	147	162	172	188	198
Vitamin B ₁₂	73	82	91	112	125
Clearances: $Q_b = 400\text{ml/min}$					
Urea	242	261	285	294	302
Creatinine	198	220	239	256	264
Phosphate	159	175	190	207	220
Vitamin B ₁₂	75	86	95	123	136
Surface (m ²)	1.0	1.2	1.5	1.8	2.0
Wall thickness/ Internal diameter (μm)	40/200				
Priming volume (ml) bloodside	58	68	90	110	121
Membrane material	Low Flux α Polysulfone				
Housing material	Polycarbonate				
Potting compound	Polyurethane				
Sterilisation	Gamma				
Units per box	20				
Art. No.	7203525	7203533	7203541	7203550	7203568

In vitro performance and physical data comply with EN 1283

(Clearances: $Q_b = 500\text{ ml/min}$, $Q_f = 0\text{ ml/min}$; UF coefficient: human blood, Hct 32%, total protein 6%, T = 37°C)